UNIVERSITY OF HAWAII

# EXPERIENTIA

REVUE MENSUELLE DES SCIENCES PURES ET APPLIQUÉES
MONATSSCHRIFT FÜR DAS GESAMTE GEBIET DER NATURWISSENSCHAFT
RIVISTA MENSILE DI SCIENZE PURE E APPLICATE
MONTHLY JOURNAL OF PURE AND APPLIED SCIENCE

Editores:
R. MATTHEY · A. v. MURALT · L. RUZICKA · J. WEIGLE
Lausanne Bern Zürich Genève-Pasadena
Redactor: H. MISLIN, Basel

VERLAG BIRKHÄUSER AG. · BASEL 10
SUISSE — SCHWEIZ — SVIZZERA — SWITZERLAND

Vol. VIII. – Fasc. 5 15. V. 1952 Fr. 3.–

SOMMAIRE - INHALT - SOMMARIO - CONTENTS

M. Matschinsky: Sur la symétrie de certains types de groupements cristallins . . . . . 165
G. V. Schulz: Molekülgrössenbestimmungen an makromolekularen Stoffen (Kritik und Vergleich der Methoden) . 171

## *Brèves communications - Kurze Mitteilungen - Brevi comunicazioni - Brief Reports*

A. Forssberg: On a Polarographic Serum Reaction and its Individual Variations . . . . . 183
R. E. Hagenbach und H. Gysin: Über einige heterozyklische Thiosemicarbazone . . . . . 184
Fr. Kradolfer: Einfluss von Antikoagulantien auf Zellkernproteine . . . . . 186
Marina De Nicola and Anna Monroy-Oddo: The Distribution of Carotenoids in the Eggs, Ovaries, and Testicles of *Paracentrotus lividus* . . . . . 187
P. Dohrn and A. Monroy: Analysis of the *in vitro* Reaction between Jelly-Coat and a Cytoplasmic Component (Antifertilizin) of Sea-Urchin Eggs . . . . . 189
A. Novelli: Action of Capsular Polysaccharide and a Polygalacturonate on the Development and the Virulence of Pneumococcus Type III . . . . . 190
A. P. De Groot: Amino Acid Requirements for Growth of the Honeybee (*Apis mellifica* L.) . . . . . 192
F. X. Wohlzogen: Die Entstehung sterischer Nachbilder . . . . . 194
J. B. Bourquin et A. Linder: L'influence des hormones cortico-surrénaliennes sur la régénération de l'épithélium cornéen du lapin; les problèmes statistiques que posent ces expériences . . . . . 194
J. Comsa: Activation thyréotrope des urines du cobaye par la rupture de l'équilibre thymus-thyroïde-gonades . . 196
R. Weber und W. Hügin: Toxizitätsmessung mittels Kleinlebewesen und elektrische Motilitätsbeobachtung . . . 197
P. Larose: On the Binding of Dyes by Monomolecular Protein Layers (Disputandum) . . . . . 198
Ch. Wunderly: Über die Farbstoffbindung durch monomolekulare Proteinschichten (Disputandum) . . . . . 199
R. E. Davies and P. A. H. Wyatt: Model Experiments for the Production of Gastric Hydrochlorid Acid (Disputandum) . . . . . 199
Z. G. Szabó and L. Csányi: Ion Exchange and Permeability (Disputandum) . . . . . 200

## *Nouveaux livres - Buchbesprechungen - Recensioni - Reviews*

Taschenbuch für Chemiker und Physiker. Von Jean D'Ans und Ellen Lax (Springer-Verlag, Berlin 1949) (Ref. H. J. Bielig) . . . . . 201
Ecological Animal Geography. By Richard Hesse, edited by W. C. Allee and K. P. Schmidt (John Wiley & Sons, New York 1951) (Ref. J. Seiler) . . . . . 201

## *Informations - Informationen - Informazioni - Notes*

Studiorum progressus: O. Bucher: Zur Analyse von Kerngrössenfrequenzkurven . . . . . 201
Corrigendum . . . . . 204

# EXPERIENTIA

L'EXPERIENTIA publiera:

1. des *articles originaux* sur les récentes recherches scientifiques écrits dans une des langues principales;
2. de *brèves communications;*
3. informera ses lecteurs des événements marquants de la vie scientifique, donnera des *comptes rendus concernant les récentes publications, les congrès et les assemblées.*

Die EXPERIENTIA stellt sich die Aufgabe:

1. durch *zusammenfassende Originalartikel* in einer der wissenschaftlichen Hauptsprachen von Autoren aus verschiedenen Ländern über Forschungsergebnisse berichten zu lassen, die im Vordergrund des Interesses stehen;
2. kurze *Mitteilungen* aufzunehmen;
3. durch Besprechung neuerschienener *Bücher*, durch Referate über *Kongresse* und *Versammlungen* sowie durch andere Mitteilungen über die bedeutendsten Ereignisse des naturwissenschaftlichen Lebens zu informieren.

EXPERIENTIA si propone di pubblicare:

1. *articoli originali riassuntivi*, in una delle principali lingue usate dalla scienza, ad opera di autori di diversi paesi, su risultati scientifici di grande interesse;
2. *brevi comunicazioni;*
3. *recensioni di nuovi libri, relazioni di congressi e riunioni*, come pure altre comunicazioni su importanti avvenimenti nel campo delle scienze naturali.

The aim of EXPERIENTIA is:

1. to publish comprehensive articles embodying the results of recent scientific research. These will be written in one of the principal scientific languages and contributed by authors in various countries;
2. to publish *brief reports;*
3. to give information about the most important events in natura, science by means of *reviews of the latest books, reports on congresses and meetings*, as well as through other communications.

**E X P E R.**


L'EXPERIENTIA paraît le 15 de chaque mois. Vente et abonnement dans toutes les librairies suisses et étrangères, ou directement chez l'éditeur. Prix du numéro fr. 3.–. Abonnement pour un an fr. 28.— pour la Suisse; pour l'étranger fr. 34.—. Ces prix s'entendent en francs suisses.

Adresser toute correspondance touchant la rédaction de l'EXPERIENTIA exclusivement à l'éditeur soussigné.

Dernier délai d'admission pour les manuscrits: 35 jours avant la parution, c'est-à-dire le 10 du mois pour le numéro du mois suivant.

Les auteurs recevront gratuitement, s'ils le désirent, 50 tirés à part de format 14,5 sur 21 cm, sans couverture. Pour le prix d'un nombre plus grand et pour la couverture s'adresser à l'éditeur. Les tirages à part doivent être commandés *avant* l'impression du périodique.

Prix pour les annonces: $^1/_1$ page fr. 220.—, $^1/_2$ page fr. 132.—, $^1/_4$ page fr. 77.—. Placements spéciaux: prix sur demande. Demandes à l'éditeur.

L'EXPERIENTIA est imprimée en Suisse.

*Editions Birkhæuser S.A.. Bâle 10 (Suisse), Elisabethenstrasse 15*
*Tél. 49800; adresse télégraphique: Edita Bâle*

Die EXPERIENTIA erscheint am 15. jedes Monats und kann im In- und Auslande durch jede Buchhandlung oder direkt vom Verlag bezogen werden. In Belgien, Dänemark, Deutschland, Finnland, Italien, Luxemburg, Marokko, Norwegen, Portugal, Schweden und Tschechoslowakei nehmen auch die Postämter Bestellungen entgegen.

Der Abonnementspreis beträgt in der Schweiz Fr. 28.—, im Ausland sFr. 34.—; die Einzelnummer kostet Fr. 3.–.

Alle Zuschriften an die Redaktion sind ausschließlich an den Verlag zu richten. Redaktionsschluß 35 Tage vor Erscheinungstermin, d.h. am 10. des Monats für den folgenden Monat.

Die Autoren erhalten auf Wunsch 50 Gratisseparata im Format 14,5 × 21 cm, ohne Umschlag. Die Kosten für weitere Separata und für Umschläge sind beim Verlag zu erfragen. Separata sind *vor* dem Druck der Zeitschrift zu bestellen.

Insertionspreise: $^1/_1$ Seite Fr. 220.—, $^1/_2$ Seite Fr. 132.— $^1/_4$ Seite Fr. 77.—; für Vorzugsseiten besondere Vereinbarung. Inseratenannahme durch den Verlag.

Die EXPERIENTIA wird in der Schweiz gedruckt.

*Verlag Birkhäuser AG., Basel 10 (Schweiz), Elisabethenstraße 15*
*Tel. 49800; Telegrammadresse: Edita Basel*

EXPERIENTIA esce a 15 di ogni mese e può esser richiesta ad ogn libreria svizzera o estera, o anche direttamente alla casa editrice. Il prezzo del singolo fascicolo è di fr. 3.–. L'abbonamento annuo è di fr. 28.— per la Svizzera; all'estero fr. 34.—. I prezzi vanno intesi in valuta svizzera.

Tutti gli invii alla redazione di EXPERIENTIA vanno indirizzati esclusivamente alla sottoindicata casa editrice.

La redazione di ogni fascicolo si chiude 35 giorni prima del termine di pubblicazione, cioè al 10 del mese, per il mese seguente.

Gli autori ricevono, su desiderio, 50 estratti del formato 14,5 × 21 cm, senza copertina. Il prezzo degli estratti in più e della copertina viene indicato, su richiesta, dalla casa editrice. Gli estratti vanno ordinati *prima* della stampa della Rivista.

Prezzi per annunci: $^1/_1$ pag. fr. 220.—, $^1/_2$ pag. fr. 132.—, $^1/_4$ pag. fr. 77.—; per pagine speciali, accordi da stabilire. Gli annunci sono da inviare alla casa editrice.

EXPERIENTIA si stampa in Isvizzera.

*Casa editrice Birkhæuser S.A., Basilea 10 (Svizzera), Elisabethenstr. 15*
*Tel. 49800; Indirizzo telegrammi: Edita Basilea*

EXPERIENTIA is published on the 15th of every month and can be obtained in any country through the booksellers or from the publishers. The price per number is fr. 3.–, by annual subscription by inland-mail fr. 28.—; other countries fr. 34.—. Prices in Swiss currency.

All communications to the editors should be addressed to the publishers. All manuscripts for publication in a given number must be in the hands of the publishers on the 10th of the preceding month.

The authors receive, on request, 50 reprints 14,5 × 21 cm without cover free of charge. For the prices of additional reprints and covers, inquiries should be addressed to the publishers. Reprints must be ordered *before* the number is printed.

Prices for advertising: $^1/_1$ page fr. 220.—, $^1/_2$ page fr. 132.—, $^1/_4$ page fr. 77.—. Advertisements should be sent to the publishers.

*Published by Birkhäuser Ltd., Basle 10 (Switzerland), Elisabethenstr. 15*
*Phone 49800; Telegrams: Edita Basle*

Printed in Switzerland / E. Birkhäuser & Cie., Basel



*Verzeichnis der Inserenten – Liste des annonceurs – List of Advertisers – Experientia VIII/5*

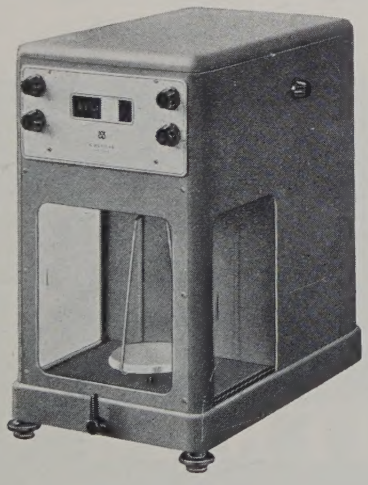
Schwitter AG., Basel
Verlag Birkhäuser AG., Basel
J. R. Geigy AG., Basel
Cilag AG., Schaffhausen
CIBA AG., Basel
Wild, Heerbrugg
Ganz & Co., Zürich
E. Mettler, Zürich

## Stativ Wild M 9

**ein neues, modernes Mikroskop**

mit der ausgezeichneten WILD-Mikro-Optik und Präzisionsausführung, speziell geeignet für Kurszwecke, Labor und Reise. Ausbaufähig für Auflicht, Phasenkontrast und Mikrophotographie. Eingebaute Stromzuführungen. Tiefliegende Bedienungsknöpfe zum bequemen Arbeiten. Moderne Verpackung mit Stahlblechhaube. Lederriemen zum bequemen Tragen. Neuartiger, hufeisenförmiger Optikbehälter, der unterhalb des Mikroskoptisches eingeschoben wird. – Ausführliche Beschreibung im Katalog Mi 511

**WILD**
HEERBRUGG



Mit der **METTLER**-Analysenwaage arbeiten Sie schneller, sicherer und genauer

Verlangen Sie Offerte
oder unverbindliche Demonstration
der verschiedenen Typen.

**E. METTLER**
**Zürich 1**

Fabrik für Analysenwaagen
Pelikanstrasse 19, Telephon 25 25 70

## EXPERIENTIA *Sammelmappe*

Diese Mappe hat den Zweck, die Hefte des laufenden Jahrganges zusammenzuhalten, bevor der komplette Jahrgang gebunden werden kann. Die einzelnen Hefte können mittels einer neuartigen patentierten Haltevorrichtung in die Mappe eingeheftet und im Bedarfsfall wieder herausgelöst werden. Mit dieser geschmackvoll in Kunstleder gebundenen Mappe soll dem Übelstand abgeholfen werden, daß einzelne Hefte im Laufe des Jahres verloren gehen und vor dem Einbinden nachbezogen werden müssen. Die Sammelmappe ist so massiv konstruiert, daß sie ihren Dienst auf Jahre hinaus leisten wird.

*Preis in Kunstleder gebunden: Fr. 6.75*

BESTELLSCHEIN

An den VERLAG BIRKHÄUSER AG., BASEL 10 (Schweiz)
Ich bestelle... Sammelmappe(n) zum Preise von Fr. 6.75

Name: Vorname:

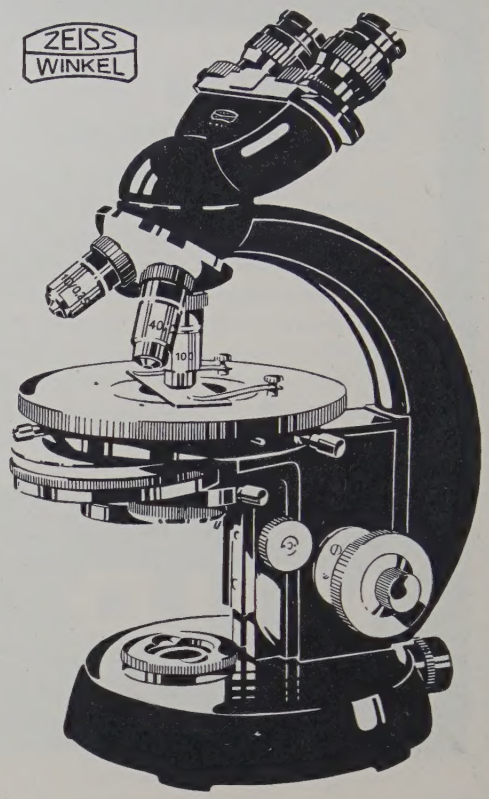
Ort: Straße:

Bitte in Blockschrift schreiben

# NEUES **ZEISS**-WINKEL
## STANDARD-MIKROSKOP GF 524

**Das Ergebnis einer hundertjährigen Tradition !**

- **Lichtstarke Einbaubeleuchtung** (Köhlersches Prinzip) für subjektive Beobachtung und Mikrophotographie
- **Tiefliegende, koaxial gelagerte Triebknöpfe für Grob- und Feineinstellung**
- **Neuartiger Gleittisch (Fettfriktion)**
- **Vollkommener Präparatschutz durch gefederte Fassung der Objektive**
- **Vergrößerungswechsler für die Okulare (ohne Okularwechsel)**
- **Vereinigter Hellfeld-Phasenkontrast-Dunkelfeld-Kondensor**
- **Neue Achromate und Neofluare**




**Auskunft und Vorführung durch die Generalvertretung für die Schweiz:**

**GANZ & Co** *Zürich*

Bahnhofstraße 40
Tel. (051) 23 97 73

*Clichés*
*in jeder Technik*

**SCHWITTER A-G**

*Basel / Zürich*

EXPERIENTIA

Vol. VIII - Fasc. 5 Pag. 165–204 15. V. 1952

# Sur la symétrie de certains types de groupements cristallins

Par M. MATSCHINSKI, Paris[1]

1° *Remarques préliminaires.* Les groupements cristallins naturels, dont la variété est presque infinie, peuvent être rationnellement divisés en deux types: *a*) groupements composés d'un très petit nombre de cristaux (ce sont, avant tout, les *macles*, ainsi que les formations ternaires, quaternaires, etc., analogues) et *b*) groupements composés d'un nombre de cristaux tellement élevé qu'il est rationnel, à plusieurs points de vue, de les considérer comme formations cristallines presque indépendantes (ce sont des «*cristalloïdes*» de toute espèce: sphérocristaux ou autres formes similaires). La différence essentielle entre ces deux types ne consiste pas, bien entendu, uniquement dans le nombre respectif de leurs cristaux, mais aussi dans le mode de coalescence de ceux-ci: chez le premier type, la coalescence n'est possible que sur des plans cristallographiques déterminés, tandis que chez le second elle est d'une nature beaucoup plus complexe – la croissance y part, par exemple, de quelque germe et, en principe, peut avoir lieu dans toutes les directions.

Pour distinguer ces deux types de groupements nous emploierons, pour abréger, les termes soulignés ci-dessus: macles et cristalloïdes.

On s'est déjà beaucoup occupé des questions de symétrie des macles (ici, de même que plus loin, nous désignons par ce terme non seulement un produit de coalescence de deux cristaux, mais le type entier se rattachant à cette forme) et, en particulier, des plans cristallographiques de coalescence possible. Certaines questions connexes ont également donné lieu à des développements théoriques et des recherches expérimentales. Par contre, les problèmes liés à la théorie de la symétrie des cristalloïdes n'ont pas encore été, à notre connaissance, l'objet d'un exposé systématique, et cela malgré l'accumulation de données extrêmement intéressantes (voir surtout les travaux de POPOFF[2]). Nous essayerons en conséquence de donner ci-après une description complète des systèmes et des classes de symétrie pouvant prendre naissance lors de la formation des groupements de ce type (sphérocristaux, etc.).

2° *Faits expérimentaux de base.* Bien entendu, les problèmes théoriques liés à la formation d'un cristalloïde (par exemple, d'un sphérocristal) croissant dans toutes les directions à partir d'un certain germe ou d'une chaîne de germes, ne se réduisent pas à la seule question des symétries pouvant naître dans un tel processus. Cette croissance dans toutes les directions exige à elle seule une explication théorique, car elle est par elle-même assez surprenante par comparaison avec la croissance d'un cristal isolé ordinaire ou avec celle d'une macle dont la coalescence ne peut avoir lieu que dans certaines directions fixes. Toutefois, ce dernier problème sort, à proprement parler, du cadre de la cristallographie et ressortit plutôt à la physique théorique. Dans le présent travail nous laisserons toutes ces questions de côté et nous bornerons uniquement à l'étude des symétries correspondantes, estimant que le fait même de croissance de pareils groupements dans toutes les directions, à l'instar de la propagation d'un rayon lumineux (d'où l'expression: «cristallisation rayonnante»), constitue un fait expérimental solidement établi surtout par les remarquables travaux de POPOFF[1] et par ceux de quelques autres auteurs (BERNAUER[2], CHOUBNIKOV[3], JANSEN[4], LEHMANN, IDDINGS, etc.).

La présence d'une des formes de cristallisation décrites ci-dessous, à savoir l'hémidièdre, a été découverte en 1948 par CAILLEUX dans les hammadas nord-sahariennes. Sur la figure 1 de sa note[5], on voit la présence d'un grand nombre de petites inclusions dont les pointes sont dirigées selon les rayons partant d'un certain centre. Les alentours de ce dernier sont remplis par une autre forme de cristallisation. Pour désigner ces formations, CAILLEUX applique le terme de «sphérolithe flammulé».

Les substances capables de former des sphérocristaux sont assez variées. Parmi les corps naturels, on peut citer la calcédoïne (pour laquelle ce phénomène a été étudié, en particulier en rapport avec la rotation

[1] Centre National de la Recherche Scientifique.

[2] B. A. POPOFF, *Sphärolithenbau und Strahlungskristallisation*, Latv. Farm. Žurn. (Riga 1934); Trav. Soc. impér. Natural. St-Pétersbourg *42*, Fasc. 1 (1911); *43*, Fasc. 1, 64–66 (1912); Fortsch. Min. Krist. Petr. *11*, 70 (1927); Z. Krist. *64*, Fasc. 5, 6 (1929).

[1] B. A. POPOFF, Latv. Farm. Žurn. (Riga 1934); Trav. Soc. impér. Natural. St-Pétersbourg *42*, Fasc. 1 (1911); *43*, Fasc. 1, 64–66 (1912); Fortsch. Min. Krist. Petr. *11*, 70 (1927); Z. Krist. *64*, Fasc. 5, 6 (1929).

[2] F. BERNAUER, Forsch. Kristallk. *2* (1929).

[3] A. CHOUBNIKOV (A. SCHUBNIKOW), Z. Krist. *65*, 297, 300 (1927).

[4] W. JANSEN, *Röntgenographische Untersuchungen über die Kristallorientierung in Sphärolithen*, Inauguraldiss. (Leipzig 1933).

[5] M. AUZEL et A. CAILLEUX, Bull. Soc. Géol. France *18*, 553 (1948).

des filaments, par MICHEL LÉVY et MUNIER CHALMAS[1], les diorites sphériques bien connues de Santa Lucia di Tallano (Corse), etc. Enfin, nous avons vu que CAILLEUX a signalé l'existence de «sphérolithes flammulés» de calcédonite. Artificiellement, on peut provoquer ce phénomène sur des substances très variées, parmi lesquelles sont particulièrement intéressantes le soufre et la cholestérine qui donnent des formations sphérocristallines même à l'état chimiquement pur, d'où il résulte que le phénomène en cause n'est pas lié à une souillure de la substance. Les travaux de WALLERANT[2], GAUBERT, LACROIX, etc. ont révélé que ce type de groupement cristallin est propre également à de nombreux composés organiques: malonamide, résorcine, acides santonique et tartrique, et beaucoup d'autres corps. CHOUBNIKOV, cité plus haut, a étudié les sphérolithes sur le salol. Nous avons observé la formation de sphérocristaux, en outre, dans le sirop de sucre.

Quant à la terminologie, signalons encore que l'expression «groupement cristallin» employée par nous ne doit être considérée que comme purement provisoire. POPOFF[3] lui-même, ainsi que JANSEN[4], tout en faisant ressortir que les dites formations ne sont pas des cristaux simples, souligne qu'elles représentent quelque chose de plus que de simples agglomérats de cristaux. Ce fait justifie d'autant plus une tentative de construire des systèmes et des classes de symétrie correspondants à ces phénomènes.

3° *Considérations générales.* Bien entendu, il serait superflu de souligner que toute symétrie cristallographique constitue une certaine idéalisation, faisant abstraction non seulement des irrégularités de température et de densité qui modifient la forme idéale des cristaux, mais surtout de la nature non infiniment petite du réseau atomique. Il est bien évident que tous les systèmes et toutes les classes de la cristallographie usuelle resteraient complètement inchangés quelles que fussent les dimensions des atomes, pourvu que restassent invariables les rapports des distances et les angles. Une abstraction analogue est applicable également dans l'exposé ci-après: supposons absents tous les accidents de température et toutes les différences de densité, admettons de même que l'équivalence des directions existe jusqu'aux angles aussi petits que l'on veut.

Nous abordons ainsi le problème de la construction d'une symétrie sphérique, cylindrique ou toute autre symétrie curviligne. Le problème lui-même n'est certainement pas nouveau. FEDOROV lui-même a publié un travail sur la symétrie de la sphère; NALIVKINE[1] a écrit un article sur la symétrie du monde organique où il exprima quelques considérations générales, enfin, on trouve dans le travail de PADOUROV[2] sur la symétrie curviligne quelques considérations géométriques simple à propos de cette notion. Malheureusement, on s'est borné jusqu'à présent surtout à des considérations générales, sans aucun rapport avec les formes réellement existantes dans la nature. Notre tâche est tout autre: construire pour le deuxième type de groupements cristallins indiqué dans nos remarques préliminaires (1°) des systèmes et des classes de symétrie essentiellement sur la base de données expérimentales et, seulement après, s'assurer que le résultat obtenu est complet, se basant sur la théorie des groupes, comme on le fait pour le système des classes des cristaux usuels.

De même que dans la construction des systèmes et des classes de symétrie usuels, nous partirons des notions de *centre*, d'*axe* et de *plan* de symétrie. Ces notions seront toutes trois appliquées sous leur forme classique usuelle: possibilité de translation des axes de rotation, réflexion à un plan, transformation relative au centre, etc. Ainsi que le montrent les expériences, une généralisation des notions de centre, d'axe et de plan de symétrie (à l'exemple de PADOUROV) n'est pas nécessaire pour la description des symétries des cristalloïdes, bien qu'elle puisse se révéler féconde pour quelques autres usages.

La principale différence entre les systèmes et classes de symétrie ainsi obtenus et les systèmes et classes de symétrie usuels consiste dans l'existence d'axes d'ordre infini, ce qui ressort directement de l'équivalence des directions (voir 5°).

Passons maintenant à l'édification systématique de la théorie.

4° *Eléments de symétrie correspondants au type examiné des groupements cristallins.* Les formations cristallographiques dont il s'agit diffèrent essentiellement des cristaux ordinaires en cela qu'elles se composent toujours d'un complexe de formations filiformes. En d'autres termes, à chaque endroit il y existe une anisotropie essentielle des directions: une direction privilégiée du filament par opposition à d'autres, identiques entre elles, perpendiculaires dans tous les sens à cette direction fondamentale. La direction de ce filament coïncide d'ordinaire avec celle de la croissance; en première approximation, ce filament est précisément un «rayon» de la cristallisation rayonnante (voir également plus bas). Ainsi, ce qu'il faut toujours considérer, ce n'est pas un élément d'espace avec ses trois angles et directions données (directions ne différant que par leurs «mesures»), ainsi qu'on le fait dans la construction d'un système de cristaux simples, mais un élément

[1] MICHEL LÉVY et MUNIER CHALMAS, Bull. Soc. franç. Minéral. *15*, 159 (1892).

[2] F. WALLERANT, Bull. Soc. franç. Minéral. *30*, 43 (1907).

[3] B. A. POPOFF, Trav. Soc. imp. Natur. St-Pétersbourg *43*, Fasc. 1, (1912); Fortsch. Min. Krist. Petr. *11*, 70 (1927); Z. Krist. *64*, Fasc. 5, 6 (1929).

[4] W. JANSEN, *Röntgenographische Untersuchungen über die Kristallorientierung in Sphärolithen*, Inauguraldiss. (Leipzig 1933).

[1] D. NALIVKINE, Bull. Inst. Biolog. Univ. Perm. *3* (8), 291 (1924) (en russe, résumé en allemand).

[2] N. PADUROV, Mém. Soc. russe Mineral. *55*, sér. 2, N° 2, 314 (1926) (en russe, résumé en allemand).

d'espace que nous désignerons, pour abréger, comme «faisceau», terme par lequel nous entendrons l'ensemble des fils ayant une direction donnée.

Ce faisceau peut être constitué de manières très différentes. Il convient de déterminer les caractères qu'il peut posséder et dont la présence ou l'absence constitue une manifestation concrète de telle ou telle autre symétrie abstraite. On peut établir pour les faisceaux examinés ici les quatre propriétés fondamentales suivantes:

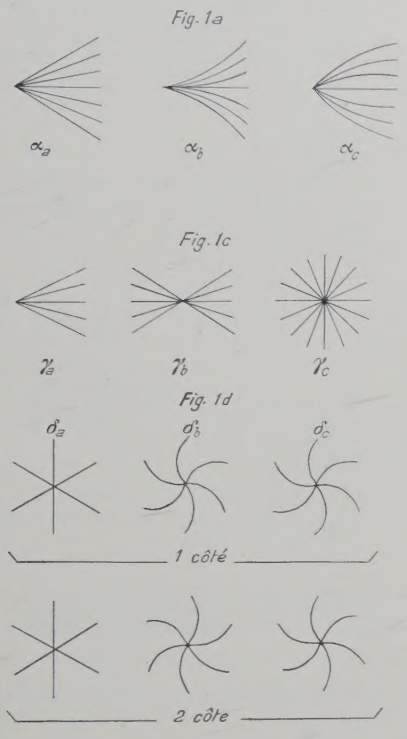



Fig. 1.

*A.* – Avant tout, il convient d'établir d'une manière ou d'une autre la nature de chaque ligne du faisceau (voir figure 1*a*). Ces lignes constitutives du faisceau peuvent être droites (cas particulièrement souligné par POPOFF) ou bien les faisceaux peuvent être formés par des courbes tournées par leur convexité ou par toutes leurs lignes vers l'extérieur (à partie du milieu du faisceau) ou vers l'intérieur. Distinguons ces trois cas par les symboles $\alpha_a$ – faisceau de chaînes rectilignes, $\alpha_b$ – faisceau de lignes divergentes (tournées par leurs convexités vers le centre du faisceau) et, enfin, $\alpha_c$ qui représente le cas inverse. On ne doit pas penser que cette incurvation soit uniquement fonction de la température. Sans doute, il n'en est pas ainsi (voir, par exemple, la figure 20 du texte, les figures 4 à 6 du premier tableau et surtout les figures 2 et 3 du deuxième tableau du travail déjà cité de POPOFF[1], où l'expérimentateur avait délibérément cherché à éviter toute irrégularité de température et où, cependant, l'incurvation est nettement visible). D'ailleurs, même si l'on rejette les deux derniers cas, la classification générale restera, ainsi qu'on le verra plus loin, pratiquement inchangée, et seul sera modifié le nombre des représentants des différents systèmes et classes.

*B.* – Le faisceau de lignes examiné doit (les lignes étant en principe non parallèles) avoir quelque lieu d'origine. Sur les photographies des coupes microscopiques, ce lieu, bien entendu, ne représente qu'un point. Or, on n'oubliera pas que ce qu'on voit au microscope n'est qu'une section d'une formation spatiale, fait signalé par de nombreux chercheurs et, avant tout, par POPOFF[1] lui-même. Examinons, par exemple, la forme découverte par cet auteur et qu'il a nommée «Zweiblatt» (bifeuille). Cette forme représente un espace rempli de deux espèces de cristaux dont l'une constitue la bifeuille même et a son centre de cristallisation au *point* initial, alors que l'autre remplit l'espace ambiant et dont les «rayons» ne partent pas d'un point, mais de tout un *anneau-cercle*. Bien entendu, sur les microphotographies, on ne voit, de ce dernier anneau, que ses deux points d'intersection avec un plan perpendiculaire à l'anneau. Cependant, le clivage d'échantillons ayant librement crû dans l'espace, tels que les diorites sphériques ou les sphérolithes de salol étudiés par CHOUBNIKOV[2] (voir ci-dessus), démontre qu'il en est effectivement ainsi. En conséquence, nous distinguerons $\beta_a$ – faisceau partant d'un point, et $\beta_b$ – faisceau partant d'un cercle.

*C.* – Cette divergence des chaînes – rayon – fils partant d'un point ou d'un cercle donnés peut être de trois espèces. Il peut s'agir (voir figure 1*c*) de $\gamma_a$ – faisceau unilatéral, de $\gamma_b$ – faisceau bilatéral et, finalement, de $\gamma_c$ – faisceau omnilatéral. La différence formelle entre ces trois faisceaux consiste en ceci: le $\gamma_a$ se compose de lignes ayant une origine et s'étendant sans limite dans une seule direction, le $\gamma_b$ se compose de lignes s'étendant sans limite dans deux directions, mais ayant un point d'intersection commun au faisceau entier; enfin, la nature de $\gamma_c$ ressort directement de la figure. Les équivalents réels de ces trois possibilités sont fournis en très grand nombre par les expériences. Des exemples de la possibilité nommée en dernier lieu sont donnés par les figures 1 et 2 du texte, par la figure 1 du premier tableau et par nombre d'autres figures du travail précité de POPOFF[1]. Comme exemple de la deuxième possibilité on peut citer la plupart des parties moyennes de la bifeuille. Enfin, un exemple de la première possibilité est toujours donné par la cristallisation rayonnante de la modification entourant la «bifeuille».

*D.* – Enfin, le dernier groupe que nous examinons, mais qui, par son importance, pourrait tout aussi bien être le premier, est la qualité de chaque filament du faisceau le long de sa direction principale, c'est-à-dire,

[1] B. A. POPOFF, Latv. Farm. Žurn. (Riga 1934).

[1] B. A. POPOFF, Latv. Farm. Žurn. (Riga 1934).
[2] A. CHOUBNIKOV, Z. Krist. *65*, 297, 300 (1927).

*Tableau I*

$\alpha_a\beta_a\gamma_a\delta_a$ - *E*-Hémitétraèdre dr. neutre (fig. 2, *5*).
$\alpha_a\beta_a\gamma_a\delta_b$ - Hémitétraèdre dr. tor. (fig. 2, *5*).
$\alpha_a\beta_a\gamma_a\delta_c$ - (impossible).
$\alpha_a\beta_a\gamma_b\delta_a$ - *E*-Tétraèdre dr. neutre (fig. 2, *11*).
$\alpha_a\beta_a\gamma_b\delta_b$ - *A*-Tétraèdre dr. tor. (fig. 2, *11*).
$\alpha_a\beta_a\gamma_b\delta_c$ - *S*-Tétdraèdre dr. tor. (fig. 2, *11*).
$\alpha_a\beta_a\gamma_c\delta_a$ - *E*-Monoèdre neutre (fig. 2, *1*).
$\alpha_a\beta_a\gamma_c\delta_b$ - *A*-Monoèdre tor. (fig. 2, *1*).
$\alpha_a\beta_a\gamma_c\delta_c$ - *S*-Monoèdre tor. (fig. 2, *1*).
$\alpha_b\beta_a\gamma_a\delta_a$ - *E*-Hémitétraèdre conc. neutre (fig. 2, *6*).
$\alpha_b\beta_a\gamma_a\delta_b$ - *E*-Hémitétraèdre conc. tor. (fig. 2, *6*).
$\alpha_b\beta_a\gamma_a\delta_c$ - (impossible).
$\alpha_b\beta_a\gamma_b\delta_a$ - *E*-Tétraèdre conc. neutre (fig. 2, *12*). / *E*-Cœlotétraèdre neutre (fig. 2, *15*).
$\alpha_b\beta_a\gamma_b\delta_b$ - *A*-Tétraèdre conc. tor. (fig. 2, *12*). / *A*-Cœlotétraèdre tor. (fig. 2, *15*).
$\alpha_b\beta_a\gamma_b\delta_c$ - *S*-Tétraèdre conc. tor. (fig. 2, *12*). / *S*-Cœlotétraèdre tor. (fig. 2, *15*).
$\alpha_b\beta_a\gamma_c\delta_a$, $\alpha_b\beta_a\gamma_c\delta_b$, $\alpha_b\beta_a\gamma_c\delta_c$ -(formes inconnues). probablement 3 formes
$\alpha_c\beta_a\gamma_a\delta_a$ - *E*-Hémitétraèdre conv. neutre (fig. 2, *7*). / *E*-Hémidièdre neutre (fig. 2, *4*).
$\alpha_c\beta_a\gamma_a\delta_b$ - *E*-Hémitétraèdre conv. tor. (fig. 2, *7*). / *E*-Hémidièdre tor. (fig. 2, *4*).
$\alpha_c\beta_a\gamma_a\delta_c$ - (impossible).
$\alpha_c\beta_a\gamma_b\delta_a$ - *E*-Tétraèdre conv. neutre (fig. 2, *13*). / *E*-Dièdre neutre (fig. 2, *3*).
$\alpha_c\beta_a\gamma_b\delta_b$ - *A*-Tétraèdre conv. tor. (fig. 2, *13*). / *A*-Dièdre tor. (fig. 2, *3*).
$\alpha_c\beta_a\gamma_b\delta_c$ - *S*-Tétraèdre conv. tor. (fig. 2, *13*). / *S*-Dièdre tor. (fig. 2, *3*).
$\alpha_c\beta_a\gamma_c\delta_a$ - *E*-Tétraèdre conv. neutre (fig. 2, *13*). / *E*-Dièdre neutre (fig. 2, *3*).
$\alpha_c\beta_a\gamma_c\delta_b$ - *A*-Tétraèdre conv. tor. (fig. 2, *13*). / *A*-Dièdre tor. (fig. 2, *3*).
$\alpha_c\beta_a\gamma_c\delta_c$ - *S*-Tétraèdre conv. tor. (fig. 2, *13*). / *S*-Dièdre tor. (fig. 2, *3*).

$\alpha_a\beta_b\gamma_a\delta_a$ - *E*-Trièdre dr. neutre (fig. 2, *8*).
$\alpha_a\beta_b\gamma_a\delta_b$ - *A*-Trièdre dr. tor. (fig. 2, *8*).
$\alpha_a\beta_b\gamma_a\delta_c$ - *S*-Trièdre dr. tor. (fig. 2, *8*).
$\alpha_a\beta_b\gamma_b\delta_a$, $\alpha_a\beta_b\gamma_b\delta_b$, $\alpha_a\beta_b\gamma_b\delta_c$, $\alpha_a\beta_b\gamma_c\delta_a$, $\alpha_a\beta_b\gamma_c\delta_b$, $\alpha_a\beta_b\gamma_c\delta_c$ -(formes inconnues). probablement 12 formes
$\alpha_b\beta_b\gamma_a\delta_a$ - *E*-Trièdre conc. neutre (fig. 2, *9*). / *E*-Cœlotrièdre neutre (fig. 2, *14*).
$\alpha_b\beta_b\gamma_a\delta_b$ - *A*-Trièdre conc. tor. (fig. 2, *9*). / *A*-Cœlotrièdre tor. (fig. 2, *14*).
$\alpha_b\beta_b\gamma_a\delta_c$ - *S*-Trièdre conc. tor. (fig. 2, *9*). / *S*-Cœlotrièdre tor. (fig. 2, *14*).
$\alpha_b\beta_b\gamma_b\delta_a$, $\alpha_b\beta_b\gamma_b\delta_b$, $\alpha_b\beta_b\gamma_b\delta_c$, $\alpha_b\beta_b\gamma_c\delta_a$, $\alpha_b\beta_b\gamma_c\delta_b$, $\alpha_b\beta_b\gamma_c\delta_c$ -(formes inconnues). probablement 12 formes
$\alpha_c\beta_b\gamma_a\delta_a$ - *E*-Trièdre conv. neutre (fig.2,*10*). / *E*-Toroïde neutre (fig. 2, *2*).
$\alpha_c\beta_b\gamma_a\delta_b$ - *A*-Trièdre conv. tor. (fig. 2, *10*). / *A*-Toroïde tor. (fig. 2, *2*).
$\alpha_c\beta_b\gamma_a\delta_c$ - *S*-Trièdre conv. tor. (fig. 2, *10*). / *S*-Torcïde tor. (fig. 2, *2*).
$\alpha_c\beta_b\gamma_b\delta_a$, $\alpha_c\beta_b\gamma_b\delta_b$, $\alpha_c\beta_b\gamma_b\delta_c$, $\alpha_c\beta_b\gamma_c\delta_a$, $\alpha_c\beta_b\gamma_c\delta_b$, $\alpha_c\beta_b\gamma_c\delta_c$ -(formes inconnues). probablement 15 formes

Remarques: [1] $\alpha_c\beta_a\gamma_b \sim \alpha_c\beta_a\gamma_c$.
[2] $\beta_a\gamma_a\delta_c$ - impossible.

non son incurvation, déjà examinée au groupe *A*, mais pour employer une expression purement formelle, sa «torsion» se manifestant physiquement par la rotation du plan de polarisation. Sans nous attarder sur ce phénomène bien connu (découvert par MICHEL LÉVY et MUNIER CHALMAS[1]), introduisons les symboles: $\delta_a$ – faisceaux constitués par des filaments non tordus – nous les appellerons, pour abréger, faisceaux neutres, $\delta_b$ – faisceaux aux filaments de même torsion en avant et en arrière du germe; nous les désignerons comme faisceaux hélicoïdaux; enfin, $\delta_c$ – faisceaux aux filaments de torsion différente en avant et en arrière du germe et que nous désignerons comme faisceaux bihélicoïdaux. Sur la figure 1*d* nous avons indiqué les symboles conventionnels correspondants. La troisième possibilité, dont la description verbale n'est peut être pas assez claire, est bien illustrée par la figure 5 du travail précité de POPOFF[2].

Après cette description des éléments constitutifs de la symétrie nous examinerons, avant d'aborder la construction de ces éléments, les formes géométriques correspondant aux différentes combinaisons de $\alpha$, $\beta$, $\gamma$ e t$\delta$.

5° *Formes géométriques typiques correspondant aux cristalloïdes.* En combinant les propriétés élémentaires $\alpha$, $\beta$, $\gamma$ et $\delta$ – dont chacune n'est prise que dans un sens déterminé *a*, *b* et *c*, on obtient une grande variété de formes dont, bien entendu, beaucoup ne se distinguent pas par leur aspect extérieur. Pour caractériser ces formes, désignons chacune d'elles par une combinaison de lettres grecques affectées en bas d'indices latins correspondants que nous ferons encore précéder d'une majuscule latine *E*, *S* ou *A*, suivant que la développement bilatéral ($\gamma_a$, $\gamma_b$ ou $\gamma_c$) est symétrique (*S*) ou asymétrique (*A*) ou qu'il existe seulement une forme unique $\gamma_a$, $\gamma_b$ ou $\gamma_c$ – (*E*). Il est rationnel de donner aux formes géométriques fondamentales des désignations correspondant au nombre de leurs surfaces. Quant aux différences correspondant aux termes $\alpha$, $\beta$ et $\delta$, il est rationnel de les désigner par des adjectifs appropriés.

Les formes à deux faces (dièdres) existant en deux variantes très différentes, nous désignerons, pour ne pas introduire un adjectif de plus (on pourrait appeler le dièdre de la figure 2, *2* représentant le cas-limite d'un

[1] MICHEL LÉVY et MUNIER CHALMAS, Bull. Soc. franç. Minéral. *15*, 159 (1892).
[2] B. A. POPOFF, Latv. Farm. Žurn. (Riga 1944).

trièdre, «dièdre triédrique», et d'une manière analogue, le dièdre de la figure 2, *3*, «dièdre tétraèdrique»), la seconde variante (fig. 2, *3*) simplement comme dièdre, en employant pour la première variante (fig. 2, *2*) l'expression «toroïde». Pour une raison analogue (brièveté) nous avons introduit, ainsi qu'on le verra plus loin, le préfixe hémi.

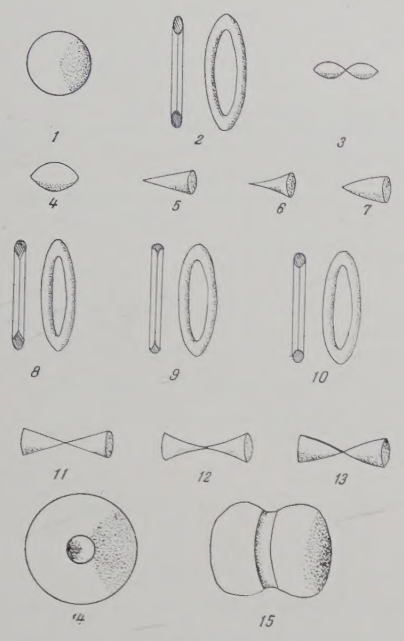



Fig. 2.

Les formes géométriques fondamentales, correspondant aux éléments $\alpha$, $\beta$, $\gamma$ et $\delta$ sont au nombre de vingt-neuf, dont chacune existe en plusieurs (de 2 à 3) variantes extérieurement semblables. Le nombre total des formes égale ainsi quatre-vingt-neuf. Parmi ces vingt-neuf formes géométriquement différentes les quinze formes suivantes: monoèdre, toroïde, dièdre, hémidièdre, trois hémitétraèdres, trois trièdres, trois tétraèdres, cœlotrièdre et cœlotétraèdre sont les plus importantes. Ils sont représentées sur les figures 2, *1* à 2, *15*. Les quatre-vingt-neuf formes, aussi bien celles géométriquement distinctes que celles ne différant pas extérieurement, sont indiquées dans le tableau I et y sont caractérisées par les symboles introduits au début de ce paragraphe.

Nous ne considérons ici cet ensemble de formes que du point de vue des types de symétrie auxquels elles appartiennent. La question des causes physiques qui les ont créés – question également d'une très grande importance – nous la laissons ici de côté. On peut trouver quelques considérations sur cette question dans l'ouvrage de base de POPOFF[1] et dans une note de CHOUBNIKOFF[2].

6° *Systèmes et classes de symétrie appartenant au type examiné de groupements cristallins.* Chacune des quatre-

[1] B. POPOFF, Latv. Farm. Žurn. (Riga 1934).

[2] A. CHOUBNIKOFF, Trav. Inst. Lomonossoff Acad. Sci. U.R.S.S. *8*, 5 (1936).

*Tableau II*

| | | |
|---|---|---|
| $C$, | $2\infty$, | $2\infty$ |
| $C$, | $2\infty$, | 1 |
| $C$, | $2\infty$, | 0 |
| $N$, | $2\infty$, | $2\infty$ |
| $N$, | $2\infty$, | 0 |
| $C$, | $\infty+1$, | $\infty+1$ |
| $C$, | $\infty+1$, | 0 |
| $C$, | 1, | 1 |
| $N$, | 1, | $\infty$ |
| $N$, | 1, | 0 |

vingt-neuf formes groupées par nous dans le tableau I peut être caractérisée par les trois éléments de symétrie dont nous avons parlé plus haut. Nous désignerons respectivement par les lettres $C$ et $N$ la présence ou l'absence d'un centre de symétrie. Introduisons un symbole à trois signes, dont le premier ($C$ ou $N$) désignera la présence ou l'absence de cette symétrie, le deuxième, le nombre d'axes de symétrie d'ordre infini plus le nombre d'axes de symétrie d'ordre fini, et le troisième, le nombre de plans de symétrie. Bien entendu, tous ces nombres peuvent être aussi bien finis qu'infinis. Illustrons l'emploi de ce symbole par des exemples. Ainsi, le monoèdre neutre, caractérisé dans le tableau I par les éléments qui le déterminent, tels que $E\ \alpha_a\ \beta_a\ \gamma_c\ \delta_\alpha$, sera maintenant figuré, étant symétrique, par le symbole ($C$, $2\infty$, $2\infty$). Les quatre-vingt-neuf formes indiquées dans le tableau I peuvent toutes être caractérisées de cette manière. Bien entendu, l'examen laborieux mais point compliqué de ces quatre-vingt-neuf formes montre qu'elles rentrent toutes dans les dix classes de symétrie (tableau II).

Les classes figurant dans le tableau II sont déjà aménagées de façon que chaque classe holoédrique (ou chaque groupe de ces classes) est suivie par la classe hémiédrique (ou par un groupe de ces classes) provenant de sa dégénérescence.

On voit ainsi que les dix classes du tableau II se groupent, d'une manière naturelle et unique, en quatre systèmes: système monoédrique (composé d'une classe holoédrique et d'une classe hémiédrique), système hélicoïdal (composé de deux classes holoédriques et d'une classe hémiédrique), système diédrique (composé, de même que le système monoédrique, seulement de deux classes) et enfin, système biclinique (composé, de même que le système hélicoïdal, de trois classes). Les systèmes de classes portent des numéros par ordre de décroissance du nombre d'axes et de plans de symétrie. Les résultats définitifs de notre recherche sont consignés dans le tableau III qui montre la distribution de toutes les formes rapportées aux systèmes et classes corres-

*Tableau III*

I. Système monoédrique

*Classe 1*
$C$, $2\infty$, $2\infty$ (holoédrique); type: sphère. Symbole:
Ex.: $E$-Monoèdre neutre, $E$-Tétraèdre dr. neutre.

*Classe 2*
$N$, $2\infty$, $2\infty$ (hémiédrique); type: demisphère. Symbole:
Ex.: $E$-Hémitétraèdre dr. neutre.

II. Système hélicoïdal

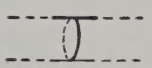
*Classe 3*
$C$, $2\infty$, 1 (holoédrique, symétrique); type: sphère (avec un plan de symétrie). Symbole:
Ex.: $S$-Monoèdre tor., $S$-Tétraèdre dr. tor.

*Classe 4*
$C$, $2\infty$, 0 (holoédrique, antisymétrique); type: sphère (sans des plans de symétrie). Symbole:
Ex.: $A$-Monoèdre tor., $A$-Tétraèdre dr. tor.

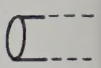
*Classe 5*
$N$, $2\infty$, 0 (hémiédrique); type: demi-sphère. Symbole:
Ex.: $E$-Hémitétraèdre dr. tor.

III. Système diédrique

*Classe 6*
$C$, $\infty+1$, $\infty+1$ (holoédrique); type: cylindre. Symbole:
Ex.: $E$-Trièdre dr. neutre, $E$-Cœlotétraèdre neutre, $E$-Tétraèdre conc. neutre, $E$-Cœlotrièdre neutre, $E$-Trièdre conc. neutre, $E$-Trièdre conv. neutre, $E$-Dièdre neutre ($\alpha_c\beta_a\gamma_b\delta_a$ et $\alpha_c\beta_a\gamma_c\delta_a$), $E$-Tétraèdre conv. neutre ($\alpha_c\beta_a\gamma_b\delta_a$ et $\alpha_c\beta_a\gamma_c\delta_a$).



*Classe 7*
$N$, 1, $\infty$ (hémiédrique); type: demi-cylindre. Symbole:
Ex.: $E$-Hémitétraèdre conc. neutre, $E$-Hémitétraèdre conv. neutre, $E$-Hémidièdre neutre.



IV. Système biclinique

*Classe 8*
$C$, $\infty+1$, 0 (holoédrique, antisymétrique); type: cylindre (sans des plans de symétrie). Symbole:
Ex.: $A$-Trièdre dr. tor., $A$-Cœlotétraèdre tor., $A$-Tétraèdre conc. tor., $A$-Cœlotrièdre tor., $A$-Trièdre conc. tor., $A$-Trièdre conv. tor., $A$-Dièdre tor. ($\alpha_c\beta_a\gamma_b\delta_b$ et $\alpha_c\beta_a\gamma_c\delta_b$), $A$-Tétraèdre conv. tor. ($\alpha_c\beta_a\gamma_b\delta_b$ et $\alpha_c\beta_a\gamma_c\delta_b$).

*Classe 9*
$C$, 1, 1 (holoédrique, symétrique); type: cylindre. (avec un plan de symétrie). Symbole:
Ex.: $S$-Trièdre dr. tor., $S$-Cœlotétraèdre tor., $S$-Trièdre conc. tor., $S$-Tétraèdre conc. tor., $S$-Cœlotrièdre tor., $S$-Trièdre conv. tor., $S$-Dièdre tor. ($\alpha_c\beta_a\gamma_b\delta_c$ et $\alpha_c\beta_a\gamma_c\delta_c$), $S$-Tétraèdre conv. tor. ($\alpha_c\beta_a\gamma_b\delta_c$ et $\alpha_c\beta_a\gamma_c\delta_c$).

*Classe 10*
$N$, 1, 0 (hémiédrique); type: demi-cylindre. Symbole:
Ex.: $E$-Hémidièdre tor., $E$-Hémitétraèdre conc. tor., $E$-Hémitétraèdre conv. tor.

V. Système asymétrique

*Classe 11*
$C$, 0, 0.

*Classe 12*
$N$, 0, 0.

pondants, avec mention des exemples dans chaque classe et système, de même que des symboles de symétrie et du type géométrique élémentaire illustrant cette classe. Nous avons conservé au terme «sphère» sa signification élémentaire générale, préférant pour désigner les formes spéciales le terme de «monoèdre».

La question étant encore insuffisamment étudiée, il est, bien entendu, prématuré de citer des exemples de groupements réels pour chacune des classes des tableaux II et III. Toutefois, à titre d'illustration, nous en donnerons, pour terminer, quelques uns.

Ainsi, les diorites sphériques de la Corse mentionnées plus haut à deux reprises sont des $S$-coelotrièdres et peuvent appartenir, suivant le sens de la rotation, à la 8e ou la 9e classe du système biclinique, et, au cas où elles seraient neutres, aussi bien à la 6e classe du système diédrique.

La première modification de la malonamide étudiée par POPOFF, vu qu'elle donne une «bifeuille» (Zweiblatt), appartient à la 8e ou à la 9e classe du système biclinique ($S$-dièdre).

Le soufre (fig. 1, *3* du tableau V du travail de POPOFF[1] cité ci-dessus) appartient, semble-t-il, à la 5e classe du système hélicoïdal.

Les sphérolithes de calcédonite étudiés par CAILLEUX[2] peuvent être classés comme les hémidièdres; ce sont, jusqu'ici, les seules formes connues (avec, peut-être, certaines formes du soufre) de classes hémiédriques.

Enfin, c'est à la 3e classe du système hélicoïdal qu'appartient la formation cristalline d'une des modifications de la malonamide représentée à la figure 1 du premier tableau de POPOFF[1], ainsi que la plupart des composés organiques étudiés auparavant par WALLERANT et par d'autres chercheurs (voir § 1).

Ce ne sont que les formes du système hélicoïdal qui étaient connues avant POPOFF. Et tout le sens de la découverte de POPOFF peut être formulé en usant des termes introduits ici pour les systèmes de groupements cristallins, comme la découverte faite par lui du système biclinique, à côté du système hélicoïdal déjà connu.

[1] B. A. POPOFF, Latv. Farm. Žurn. (Riga 1934).
[2] M. AUZEL et A. CAILLEUX, Bull. Soc. Géol. France *19*, 553 (1949).

Nous avons remis à une autre note[1] les considérations relatives à une généralisation possible, basée sur le phénomène de «double torsion» découvert par M. Garrido[2], ainsi que les remarques sur la place des systèmes décrits ici entre les systèmes de cristallographie usuelle et les systèmes de symétrie d'un discontinuum[3, 4].

[1] M. Matschinski, Bull. Soc. franç. Min. Crist. Vol. LXXV., n° 1–3, 161 (1952).

[2] J. Garrido, Z. Krist. [A] *95*, 189 (1936).

[3] K. Weissenberg, *Die allgemeine geometrische Strukturtheorie der Materie*, dans: *Handbuch der physikalischen und technischen Mechanik*, publié par F. Auerbach et W. Hort, vol. 4, 2e partie (Verlag Barth, Leipzig, 1931), p. 154–271.

[4] P. Niggli, Z. Krist. *63*, 172 (1926).

*Summary*

An investigation was made of the kinds of symmetry of crystalline groups (crystalloids) with infinite symmetry axes. The experiments give symmetry elements (Fig. 1*a*, 1*c*, 1*d*) with which a total of 89 forms can be constructed correspondingly. The most important of these forms are reproduced in Figure 2, *1–15*. They belong to 10 classes of symmetry which are shown in Table II. The fact that the holoedric and the hemiedric classes correspond to one another makes it possible to order these 10 classes into 4 systems (not counting the fifth, an asymmetric system). In Table III, a general survey of the systems and classes is given, together with examples of forms from each class. Finally examples deriving from experiments corresponding to these theoretical schemes, are given.

# Molekülgrößenbestimmungen an makromolekularen Stoffen

## (Kritik und Vergleich der Methoden)

Von G. V. Schulz[1], Mainz

### I. *Einleitung*

Das Molekulargewicht ist eine der wichtigsten charakteristischen Größen eines makromolekularen Stoffes, von welcher alle weiteren Stoffeigenschaften mehr oder weniger stark mitbestimmt werden. Die Weiterentwicklung der präparativen, physikalischen und physiologischen Chemie der makromolekularen Stoffe ist daher von dem Ausbau und der Präzisierung der Methoden zur Molekulargewichtsbestimmung abhängig. Es hat sich ferner gezeigt, daß dieselben Methoden, welche zur Ermittelung des Molekulargewichts benutzt werden, wichtige Möglichkeiten bieten, um weitere molekulare Eigenschaften zu bestimmen, wie die Gestalt der Moleküle, ihre innere Beweglichkeit und ihre energetische Wechselwirkung mit den Molekülen von Lösungsmitteln. Im folgenden wird ein Überblick über den heutigen Stand der Methoden zur Molekulargewichtsbestimmung gegeben, wobei besonderer Wert darauf gelegt wird, die Grenzen der verschiedenen Methoden abzuschätzen und sie in ihren Ergebnissen miteinander zu vergleichen.

Wir verfügen heute über eine ganze Anzahl voneinander unabhängiger Methoden, die in absolute und relative Methoden einzuteilen sind. In die Auswertung einer Absolutmethode gehen neben leicht bestimmbaren Stoffkonstanten (wie Dichte, Brechungsindex usw.) nur universelle Konstanten ein, wie die Gaskonstante oder die Loschmidtsche Zahl. Zur Zeit stehen drei Absolutmethoden zur Verfügung.

1. *Die osmotische Methode.* Da der osmotische Druck in erster Linie nur von der Teilchenzahl abhängt, liefert er unabhängig von der speziellen Auswertungsmethode einen bestimmten Durchschnittswert des Molekulargewichts. Der Verfasser schlug vor, diesen Wert als «mittleres Molekulargewicht» zu bezeichnen und ihn dadurch aus den Durchschnittswerten der anderen Methoden herauszuheben. Man bezeichnet ihn auch als Zahlendurchschnitt (number average). Es ist der allein brauchbare Durchschnittswert, wenn man das Molekulargewicht mit stöchiometrischen Zahlenwerten in Beziehung setzen will sowie bei reaktionskinetischen und thermodynamischen Untersuchungen. – Aus den Abweichungen vom van-t'Hoffschen Gesetz, die bei osmotischen Messungen an makromolekularen Stoffen fast allgemein auftreten, kann man Schlüsse über die Gestalt der gelösten Teilchen sowie ihrer Wechselwirkung mit dem Lösungsmittel ziehen.

2. *Ultrazentrifuge und Diffusion.* Diese Methode spricht auf die Masse der Teilchen an. Bei polymolekularen Stoffen werden die Teilchen verschiedener Größe im Zentrifugalfeld auseinandergezogen, so daß man durch diese Methode Aufschluß über Einheitlichkeit oder Uneinheitlichkeit des untersuchten Stoffes bekommt. Ferner liefert die Methode den molekularen Reibungsfaktor $f$, der Aufschluß über die Gestalt der gelösten Teilchen gibt.

3. *Die Lichtzerstreuung.* Diese jüngste Methode ist der mannigfaltigsten Anwendungen fähig. Sie liefert bei polymolekularen Stoffen einen Durchschnittswert, der nahe dem Gewichtsdurchschnitt (weight average), und je nach Stärke der Uneinheitlichkeit mehr oder weniger weit über dem mittleren Molekulargewicht liegt. Durch genaue Vermessung der Wellenlängen- und Winkelabhängigkeit des Streulichts erhält

[1] Institut für physikalische Chemie der Universität Mainz.

man Aufschluß über die räumlichen Abmessungen der gelösten Teilchen. Die Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit liefert Angaben über die Wechselwirkung mit dem Lösungsmittel und Assoziationszustände. Versuchstechnik und Theorie dieser Methode sind noch stark im Fluß.

Von den relativen Methoden ist am wichtigsten die von Staudinger eingeführte viskosimetrische. Sie ist sehr einfach und genau durchzuführen; die Auswertung ist jedoch erst nach Eichung durch eine Absolutmethode möglich.

Bevor wir zur Beschreibung der einzelnen Methoden übergehen, muß noch einiges über die Polymolekularität gesagt werden, eine Eigenschaft makromolekularer Stoffe, welche bei jeder exakten Molekulargewichtsbestimmung berücksichtigt werden muß.

## II. *Polymolekularität*[1]

Viele makromolekulare Stoffe bestehen aus zahlreichen Komponenten verschiedenen Molekulargewichts. Da die Methoden der Molekulargewichtsbestimmung auf diese als Polymolekularität bezeichnete Eigenschaft in verschiedenartiger Weise ansprechen, muß hier das Wichtigste über ihre quantitative Behandlung erwähnt werden.

Wir stellen uns vor, daß wir ein Gemisch verschiedener Polymerer vor uns haben. Es sei hierin $m_P$ der Massenanteil der Komponente mit dem Polymerisationsgrad $P$ (das heißt, in 1 g Gemisch sei $m_P$ Gramm der Komponente mit dem Polymerisationsgrad $P$ enthalten). Offenbar ist dann

$$\sum_{P=1}^{\infty} m_P = 1. \tag{1}$$

Ferner ist $m_P/M$ die Molzahl dieser Komponente in 1 g Gemisch, wobei $M$ deren Molekulargewicht bedeutet. Weiterhin ist $M = PM_g$, wobei $M_g$ das Molekulargewicht des Grundmoleküls ist. Dann sind in *einem Grundmol* (das heißt $M_g$ Gramm) des Gemisches

$$n_P = \frac{m_P}{P} \tag{2}$$

Mole der Komponente mit dem Polymerisationsgrad $P$. Die Summe

$$\bar{n} = \sum_{P=1}^{\infty} n_P = \sum_{P=1}^{\infty} \frac{m_P}{P} \tag{3}$$

gibt an, wieviel Mole polymerer plus monomerer Substanz in einem Grundmol Gemisch vorhanden sind.

Die Zahlen $m_P$ bzw. $n_P$ sind Funktionen des Polymerisationsgrades $P$, welche wir mit $H(P)$ bzw. $h(P)$ bezeichnen:

$$m_P = H(P), \tag{4a}$$

$$n_P = \frac{H(P)}{P} = h(P). \tag{5a}$$

[1] G. V. Schulz, Z. physik. Chem. [B] *32*, 27 (1936); *47*, 155 (1940); J. makromol. Chem. *1*, 131 (1943).

Haben wir eine lückenlose Reihe von Polymerisationsgraden in dem zu untersuchenden Stoff vor uns – wie es bei synthetischen Hochpolymeren fast ausnahmslos der Fall ist –, dann ist es zweckmäßig, den Polymerisationsgrad als stetig veränderliche Größe zu betrachten. Wir sagen dann, $dm$ ist der Massenanteil aller Komponenten, deren Polymerisationsgrad zwischen $P$ und $P + dP$ liegt. Die Funktionen (4) und (5) erhalten dann die Form

$$dm = H(P)\, dP, \tag{4b}$$

$$dn = h(P)\, dP = \frac{H(P)}{P}\, dP. \tag{5b}$$

Man bezeichnet $H(P)$ als Massenverteilungs- und $h(P)$ als Häufigkeitsverteilungsfunktion. In Abbildung 1 ist

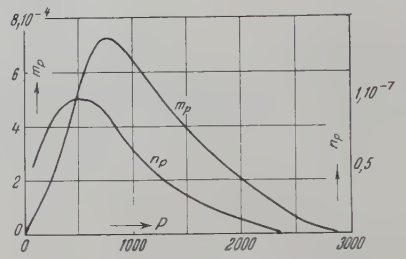



Abb. 1. Massenverteilungsfunktion ($mP$) und Häufigkeitsverteilungsfunktion ($nP$) eines Polystyrols[1].

eine spezielle Funktion dieser Art, die häufig bei synthetischen Hochpolymeren auftritt, graphisch dargestellt[1]. Ihre mathematische Formulierung lautet

$$H(P) = \frac{\ln^2 \alpha}{2} P^2 \alpha^P, \tag{6a}$$

$$h(P) = \frac{\ln^2 \alpha}{2} P \alpha^P. \tag{6b}$$

Hierin ist $\alpha$ eine Zahl, die dicht unter 1 liegt (zum Beispiel 0,99). Setzt man (6) in (4) oder (5) ein, so kann man den Massenanteil bzw. die Molzahl jedes einzelnen Polymeren im Gemisch berechnen.

Das mittlere Molekulargewicht $\overline{M}$ definiert man zweckmäßig als diejenige Zahl, durch welche eine gegebene Menge des Stoffes zu dividieren ist, um die darin enthaltene Anzahl Mole zu erhalten. Gehen wir von einem Grundmol aus, so ist daher unter Berücksichtigung von (3)

$$\overline{M} = \frac{M_g}{\bar{n}}. \tag{7}$$

Der mittlere Polymerisationsgrad $\overline{P} = \overline{M}/M_g$ ist dann

$$\overline{P} = \frac{1}{\bar{n}} = \frac{1}{\sum_{P=1}^{\infty} n_P}. \tag{8}$$

Führt man die Verteilungsfunktion nach (5) oder (6) ein, so kommt man zu der mathematisch sehr über-

[1] G. V. Schulz und A. Dinglinger, Z. physik. Chem. *43*, 47 (1939) (Polystyrol II).

sichtlich zu handhabenden Formulierung

$$\bar{P} = \frac{1}{\int_1^\infty h(P)\, dP}. \qquad (9)$$

Der so definierte mittlere Polymerisationsgrad wird von denjenigen Molekulargewichtsbestimmungsmethoden erhalten, die auf die Teilchen*zahl* in einer gegebenen Lösung ansprechen, also insbesondere von den osmotischen Methoden (osmotischer Druck, Kryoskopie, Ebullioskopie). Eine Methode, die unmittelbar auf die *Größe* der Teilchen anspricht (Viskosimetrie, Lichtzerstreuung) liefert einen anderen Durchschnittswert, der – wie der Verfasser zeigte –, der Gleichung

$$P_w = \Sigma\, P^2\, n_P = \int_{P=1}^{\infty} P^2\, h(P)\, dP \qquad (10)$$

gehorcht. Bei einheitlichen Stoffen ist $\bar{P} = P_w$; bei uneinheitlichen Stoffen ist stets $\bar{P} < P_w$ [1].

Von etwas anderen Vorstellungen ausgehend definieren Lansing und Kraemer[2] zwei Durchschnittswerte, den *Zahlendurchschnitt*

$$P_n \equiv \frac{\Sigma\, c_i}{\Sigma\, c_i / P_i} \qquad (11)$$

und den *Gewichtsdurchschnitt*

$$P_w \equiv \frac{\Sigma\, c_i\, P_i}{\Sigma\, c_i}. \qquad (12)$$

Es läßt sich leicht zeigen, daß die Durchschnittswerte (11) und (12) mit den in den Gleichungen (8) und (10) definierten übereinstimmen.

Man denkt sich den Stoff in Lösung mit der Gesamtkonzentration $c_0$; $P_i$ und $c_i$ sind der Polymerisationsgrad und die Konzentration der $i$-ten Komponente. Offenbar ist der Massenanteil der $i$-ten Komponente $m_i = c_i/c_0$ und die Molzahl der $i$-ten Komponente in einem Grundmol des Stoffes $n_i = m_i/P_i$. Ferner ist $\Sigma\, m_i = 1$. Daraus ergibt sich

$$P_n = \frac{\Sigma\, c_i/c_0}{\Sigma\, c_i/c_0 \cdot 1/P_i} = \frac{\Sigma\, m_i}{\Sigma\, m_i/P_i} = \frac{1}{\Sigma\, n_i}, \qquad (13)$$

$$P_w = \frac{\Sigma c_i/c_0 \cdot P_i}{\Sigma\, c_i/c_0} = \frac{\Sigma\, m_i\, P_i}{\Sigma\, m_i} = \Sigma\, P_i^2 n_i. \qquad (14)$$

Vergleicht man die Gleichungen (13) bzw. (14) mit (8) bzw. (10), so erkennt man, daß $P_n = \bar{P}$ ist und $P_w$ bei beiden Definitionen übereinstimmt.

Lansing und Kraemer definieren noch einen dritten Durchschnittswert

$$P_Z = \frac{\Sigma\, c_i\, P_i^2}{\Sigma\, c_i\, P_i}, \qquad (15)$$

der bei der Auswertung von Messungen mit der Ultrazentrifuge eine Rolle spielt.

### III. *Die osmotische Methode*

Die halbdurchlässige Membran wird heute meistens auf Zellulosebasis hergestellt. Man geht zum Beispiel von Kollodiumlösung aus, trocknet diese in geeigneter Form ein und kann die so gewonnene Membran unmittelbar für wässerige Lösungen verwenden[1]. Je nach den Trocknungsbedingungen ist die Durchlässigkeit verschieden stark. Durch Denitrierung gewinnt man aus einer solchen Membran eine Membran aus reiner Zellulose, welche für fast alle organischen Lösungsmittel verwendbar ist. Auch Cellophanmembranen werden benutzt, deren Durchlässigkeit durch verschiedene Vorbehandlungen abgestuft werden kann[2].

Die einfachste Osmometerform ist ein Säckchen aus dem Membranmaterial, welches oben verschlossen und mit einem Steigrohr versehen ist. Neuerdings verwendet man jedoch immer ausschließlicher flache Membranen, welche in eine aus festem Material hergestellte Zellenkonstruktion eingespannt sind[3]. Das hat den Vorteil, daß das Volumen der Lösung schärfer definiert ist und daß ferner flache Membranen genauer zu reproduzieren sind. Die Lösung der Membranfrage ist offenbar um so einfacher, je höher das zu bestimmende Molekulargewicht ist. Verhältnismäßig leicht bestimmbar sind Molekulargewichte über 20000. Darunter treten mit abnehmendem Molekulargewicht zunehmende Schwierigkeiten auf, welche der osmotischen Methode in der Gegend von 10000 eine bisher nur selten überschrittene Grenze setzen.

Die Auswertung geschieht nach der van-t'Hoffschen Gleichung

$$p = \frac{R\,T c}{M} \quad \text{bzw.} \quad M = \frac{R\,T c}{p} \qquad (16)$$

($p$ = osmotischer Druck, $c$ = Konzentration in g/l). Auf Grund von Gleichung (16) wäre nur *eine* osmotische Messung bei einer bestimmten Konzentration nötig, um das Molekulargewicht zu erhalten. Die Erfahrung zeigt jedoch, daß dieses nur selten möglich ist, da $p$ und $c$ im allgemeinen nicht den einfachen linearen Zusammenhang der Gleichung (16) haben. Mit einiger

*Tabelle I*

Osmotischer Druck von Serumalbumin in isoelektrischer Lösung (Burk[4])

| $c$ g/l Lösungsmittel | $p$ cm $H_2O$ | $p/c$ |
|---|---|---|
| 7,8 | 2,39 | 0,306 |
| 12,5 | 4,01 | 0,320 |
| 27,9 | 8,53 | 0,306 |
| 28,2 | 8,68 | 0,308 |
| 33,8 | 10,80 | 0,319 |
| 34,9 | 10,91 | 0,313 |
| 41,8 | 13,1 | 0,311 |
| 89,8 | 27,84 | 0,310 |
| 124,5 | 37,69 | 0,302 |

[1] W. Kern, Ber. dtsch. chem. Ges. *68*, 1439 (1935).

[2] W. D. Lansing und E. O. Kraemer, J. Amer. Chem. Soc. *57*, 1369 (1935).

[1] R. E. Montonna und T. L. Jilk, J. physic. Chem. *45*, 1374 (1941).

[2] S. R. Carter und B. R. Record, J. Chem. Soc. *1939*, 660, 664.

[3] G. V. Schulz, Z. physik. Chem. [A] *176*, 317 (1936). – F. M. Fuoss und M. Mead, J. physic. Chem. *47*, 59 (1943). – J. Jullander, Ark. Kem. Mineral. Geol. [A] *21*, 3./4. Teil, Nr. 8 (1946). – H. Hellfritz, Makromol. Chem., *7*, 184 (1951).

[4] N. F. Burk, J. Biol. Chem. *98*, 353 (1932).

Annäherung gilt (16) nur bei Proteinen in isoelektrischer Lösung, deren Moleküle weitgehend isodiametrisch sind (Ovalbumin, Serumalbumin, vgl. Tabelle I).

In der Regel steigt bei makromolekularen Stoffen $p$ stärker als linear mit der Konzentration an. Am deut-

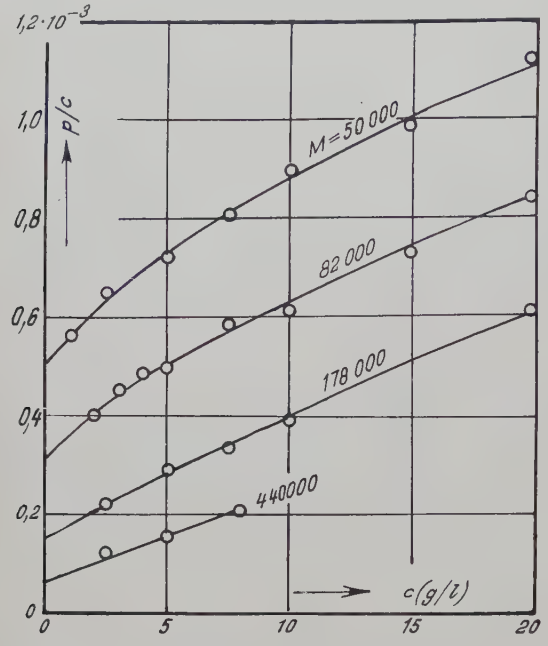



Abb. 2. Reduzierter osmotischer Druck ($p/c$) in Abhängigkeit von der Konzentration bei Nitrozellulosen in Azeton[1].

lichsten erkennt man das, wenn man graphisch den reduzierten osmotischen Druck $p/c$ gegen die Konzentration aufträgt, wie es in den Abbildungen 2 und 3 für

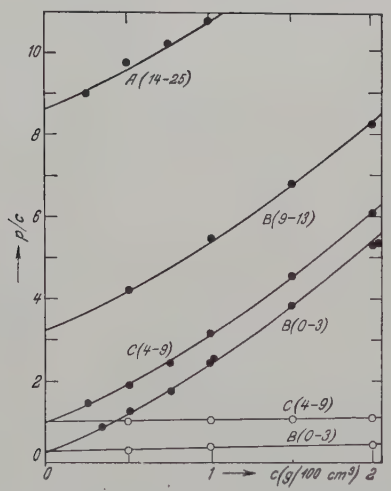



Abb. 3. Reduzierter osmotischer Druck in Abhängigkeit von der Konzentration bei Polyisobutylenen in Cyclohexan (•) und Benzol (○)[2].

verschiedenartige Systeme geschehen ist. Wie man aus Tabelle 1 erkennt, ist bei den Proteinen der Anstieg der Kurven sehr schwach und oft kaum bemerkbar, dagegen ist er sehr erheblich bei den linearen Polymeren Nitrozellulose[1] und Polyisobutylen[2]. In solchen Fällen geht man bei der Berechnung des Molekulargewichtes von der Annahme aus, daß diejenigen Einflüsse, welche die Abweichungen von der idealen Gleichung (16) verursachen, bei abnehmender Konzentration allmählich verschwinden. Man bildet dann – am einfachsten durch graphische Extrapolation – den Grenzwert von $p/c$ für die Konzentration $O$ und setzt diesen in (16) ein. Dann erhält man das Molekulargewicht nach der Gleichung

$$M = \frac{R\,T}{\lim\limits_{c \to 0} p/c}\,. \qquad (17)$$

Über den Anstieg der $p/c$-Kurven bei Hochpolymeren ist theoretisch sehr viel gearbeitet worden, teils um die Extrapolation mit größerer Sicherheit ausführen zu können, teils weil man hieraus Aufschluß über den Lösungszustand und andere Eigenschaften der Makromoleküle erhält. Rein empirisch kann man den osmotischen Druck als Potenzreihe von $c$ darstellen und erhält dann

$$p = \frac{RT}{M}\,c + B\,c^2 + C\,c^3 + \cdots \qquad (18a)$$

bzw.

$$\frac{p}{c} = \frac{RT}{M} + Bc + Cc^2 + \cdots. \qquad (18b)$$

Ist der Konzentrationsbereich nicht zu groß, so kann man oft mit einiger Näherung das dritte Glied vernachlässigen; die Kurven steigen dann linear an und

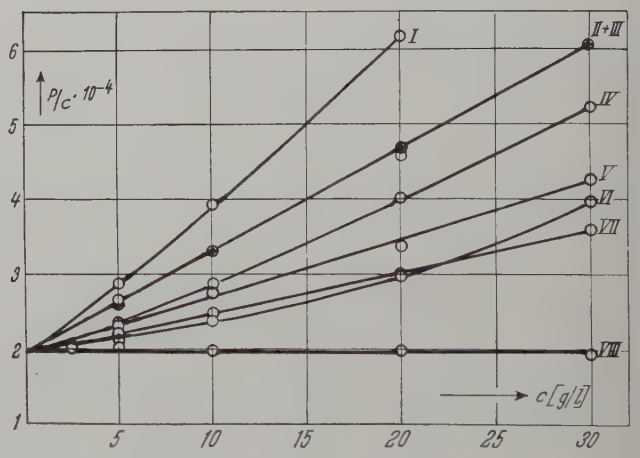



Abb. 4. Osmotische Kurven (wie Abb. 2 und 3) an Polymethacrylsäure-Methylester in verschiedenen Lösungsmitteln; (Molekulargewicht: 138000).

| | | | |
|---|---|---|---|
| I | Chloroform | V | Toluol |
| II | Dioxan | VI | Diäthylketon |
| III | Benzol | VII | Azeton |
| IV | Tetrahydrofuran | VIII | m-Xylol |

lassen sich leicht zur Konzentration $O$ zurückextrapolieren. Die Extrapolation ist dann besonders einfach, wenn die Kurvenschar einer polymerhomologen Reihe

[1] G. V. Schulz, Z. physik. Chem. *176*, 317 (1936).
[2] P. J. Flory, J. Amer. Chem. Soc. *65*, 372 (1943).

[1] G. V. Schulz, Z. physik. Chem. *176*, 317 (1936).
[2] P. J. Flory, J. Amer. Chem. Soc. *65*, 372 (1943).

parallel ist, das heißt, wenn $B$ unabhängig vom Molekulargewicht ist. Das ist beim Polyisobutylen zwar annähernd der Fall (Abb. 3), jedoch ist es nicht die Regel. Im allgemeinen nimmt $B$ mit zunehmendem Molekulargewicht ab. $B$ ist ferner sehr stark abhängig vom Lösungsmittel, wie zuerst Dobry bemerkt hat[1]. Eine neue Meßreihe von H. Doll aus unserem Institut ist in Abbildung 4 dargestellt[2]. Wesentlich ist, daß das erste Glied in Gleichung (18) vom Lösungsmittel unabhängig ist; hieraus geht hervor, daß das Molekulargewicht eine eindeutige Konstante des gelösten Stoffes ist. Je schlechter das Lösungsmittel, um so kleiner $B$.

Die Deutung der beschriebenen Abweichungen vom Idealverhalten geht von der Thermodynamik und ihrer Grundlage, der statistischen Mechanik, aus. Bezeichnen wir mit $\Delta\mu_1$, $\Delta h_1$ und $\Delta s_1$ das chemische Potential des Lösungsmittels in der Lösung, die differentielle Verdünnungswärme und die differentielle Verdünnungsentropie, so gelten die Gleichungen

$$\Delta\mu_1 = -p\,\bar{v}_1 \tag{19}$$

und

$$\Delta\mu_1 = \Delta h_1 - T\,\Delta s_1 \tag{20}$$

($\bar{v}_1$ partielles Molvolumen des Lösungsmittels in der Lösung). In einer «athermischen» Lösung ist $\Delta h_1 = 0$ und somit

$$p = \frac{1}{v_1}\,\Delta s_1. \tag{21}$$

Ein Spezialfall der athermischen Lösung ist die ideale Lösung, in welcher

$$\Delta s_1 = R \ln x_1 = -R \ln (1 - x_2) \tag{22a}$$

ist. Ist der Molenbruch $x_2$ des gelösten Stoffes sehr klein, so wird

$$\Delta s_1 = R\,x_2 = R\,\frac{n_2}{n_1} \tag{22b}$$

und unter Verwendung von (21)

$$p = \frac{n_2}{n_1\,\bar{v}_1}\,RT, \tag{23}$$

($n_1$ und $n_2$ sind die Molzahlen von Lösungsmittel und Gelöstem). Da $n_1\bar{v}_1$ gleich dem Gesamtvolumen ist, ist Gleichung (23) mit der von van t'Hoff (16) identisch.

Die für eine ideale Lösung charakteristische Eigenschaft, daß die Größe $B = 0$ ist, ist, wie aus obigem hervorgeht, von zwei Bedingungen abhängig: Es muß $\Delta h_1 = 0$ sein, und $\Delta s_1$ muß der Gleichung (22) gehorchen. Hat $B$ einen endlichen Wert, so kommen also hierfür von vornherein zwei Ursachen in Frage. Bei Lösungen von Linearpolymeren wird $B$ anscheinend überwiegend durch die Wechselwirkung mit dem Lösungsmittel bestimmt. Hohe Werte von $B$ gehen mit stark exothermer Verdünnungswärme parallel. Bei Proteinlösungen ist wahrscheinlich $\Delta h_1 \approx 0$; hier sind die Abweichungen von der Idealität daher überwiegend durch das Glied $T\Delta s_1$ bestimmt. Neuere statistische Rechnungen[3] zeigten nun, daß bereits ein merklicher positiver $B$-Wert auftritt, wenn die gelösten Teilchen größer als die Lösungsmittelmoleküle sind. Noch höhere $B$-Werte treten auf, wenn die Teilchen langgestreckt sind. Man kann daher unter Umständen aus dem osmotisch gemessenen $B$-Wert das Achsenverhältnis langgestreckter Proteinmoleküle berechnen (Globulin, Myosin)[1,2].

In früheren Arbeiten wurde aus dem Anstieg der $p/c$-Kurven vielfach nach einer vereinfachten van-der-Waalschen Gleichung die Größe der Solvathülle berechnet. Die neueren theoretischen Ansätze zeigten jedoch, daß diese anschauliche Deutung von zweifelhaftem Wert ist, wenn auch die daraus abgeleiteten Gleichungen oft von praktischem Nutzen bei der Extrapolation sind.

Die untere Grenze für osmotische Messungen liegt, wie schon gesagt, zur Zeit bei etwa 10000–20000, die obere Grenze bei etwa $10^6$. Höhere Molekulargewichte geben zu geringe osmotische Effekte. Die osmotische Methode liefert unmittelbar das mittlere Molekulargewicht bzw. den mittleren Polymerisationsgrad nach (8), was als ein besonderer Vorteil anzusehen ist. Die anderen Durchschnittswerte, zum Beispiel $P_w$, lassen sich unmittelbar kaum verwenden, weil sie nicht auf die Teilchen*zahl* bezogen sind. So käme man zum Beispiel zu ganz falschen Werten, wenn man unter Verwendung von $P_w$ statt $\overline{P}$ irgendwelche stöchiometrischen Verhältnisse (zum Beispiel Endgruppengehalt) berechnen wollte. Auch bei reaktionskinetischen und thermodynamischen Untersuchungen ist nur $\overline{P}$ verwendbar.

## IV. *Ultrazentrifuge und Diffusion*[3]

Die von Svedberg ausgearbeitete Methode beruht darauf, daß man zwei verschiedene Bewegungszustände der gelösten Teilchen untersucht:

1. Eine erzwungene Bewegung in einem starken Zentrifugalfeld. Als Maßzahl gewinnt man hierbei die Sedimentationskonstante $s$, das ist die Geschwindigkeit, welche die Teilchen in einem Zentrifugalfeld der Stärke 1 erhalten. Definitionsgemäß ist daher

$$s = \frac{dx}{dt} \cdot \frac{1}{\omega^2\,x} \tag{24}$$

($x$ = Abstand vom Rotationszentrum, $dx/dt$ die gemessene Geschwindigkeit der sedimentierenden Moleküle, $\omega$ = Winkelgeschwindigkeit). Das Molekulargewicht hängt mit $s$ nach der Gleichung

$$M = \frac{s\,f}{1 - V\varrho} \tag{25}$$

zusammen ($V$ = partielles spezifisches Volumen der gelösten Substanz, $\varrho$ = Dichte der Lösung).

Hierbei bleibt der molekulare Reibungsfaktor $f$, das ist der Reibungswiderstand, den 1 Mol der Teilchen bei der Geschwindigkeit 1 erfahren, unbestimmt.

[1] A. Dobry, J. Chim. Phys. *32*, 50 (1935); Koll. Z. *81*, 190 (1937). – Vgl. ferner: H. Staudinger und G. V. Schulz, Ber. dtsch. Chem. Ges. *70*, 1577 (1937).

[2] G. V. Schulz und H. Doll, Z. Elektrochem. *56* (1952), im Druck.

[3] G. V. Schulz, Z. Naturforschg. *2a*, 27, 411 (1947). – M. L. Huggins, J. phys. Colloid Chem. *52*, 248 (1948).

[1] G. V. Schulz, Z. Naturforschg. *2a*, 27, 411 (1947). – M. L. Huggins, J. phys. Colloid Chem. *52*, 248 (1948).

[2] H. Porzehl und H. H. Weber, Z. Naturforschg. *5b*, 75 (1950).

[3] Vgl. The Svedberg und K. O. Pedersen, *Die Ultrazentrifuge* (Steinkopf, Dresden und Leipzig 1940).

2. Die freiwillige Bewegung der Diffusion, welche nach dem Fickschen Gesetz

$$\frac{dn}{dt} = D \frac{dc}{dx} F \tag{26}$$

die Diffusionskonstante $D$ liefert (durch die Fläche $F$ treten in der Zeiteinheit $dn/dt$ Mole hindurch). Wie Einstein ableitete, ist für eine ideale Lösung

$$D = \frac{RT}{f} . \tag{27}$$

Setzen wir das in (25) ein, so erhalten wir die Gleichung von Svedberg

$$M = \frac{R\,T\,s}{D\,(1 - V\,\varrho)} , \tag{28}$$

in welcher auf der rechten Seite nur experimentell bestimmbare Größen stehen.

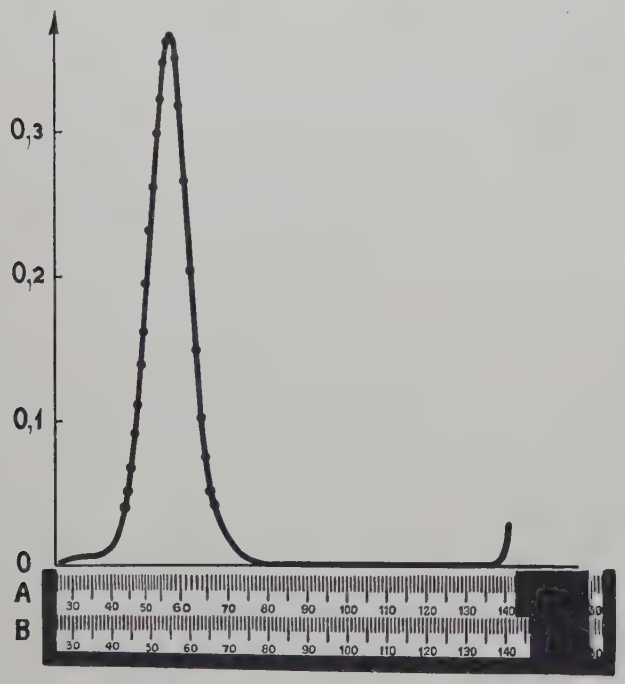



Abb. 5. Sedimentationskurve mit Skala ($A$) und Referenzskala ($B$) eines Proteins[1].

Auf experimentelle Einzelheiten kann hier nicht eingegangen werden (es sei auf das Buch von Svedberg und Pedersen verwiesen). Es kommt darauf an, sowohl bei der Sedimentation wie bei der Diffusion den Konzentrationsverlauf, bzw. den Verlauf des Konzentrationsgradienten $dc/dx$, in einer entsprechenden Zelle zu verschiedenen Zeiten nach Versuchsbeginn zu messen. Am genauesten ist die von Lamm ausgearbeitete Methode, bei welcher eine Skala durch die Lösung (senkrecht zur Richtung der Sedimentation bzw. Diffusion) hindurchphotographiert wird. Die Skalenstriche werden dabei derart verschoben, daß der Betrag der Verschiebung dem Konzentrationsgradienten $dc/dx$ an der betreffenden Stelle direkt proportional ist. Einfacher, aber nicht so genau ist die Töplersche Schlierenmethode, welche eine Lichtmarke an der Stelle des maximalen Konzentrationsgradienten liefert, die sich bei der Sedimentation mit der Geschwindigkeit $dx/dt$ längs der Zelle verschiebt. Eine neuerdings vielfach verwendete Methode von Philpot-Svenssen liefert durch einen optischen Trick direkt eine Kurve, die den Konzentrationsgradienten für jede Stelle der Zelle angibt.

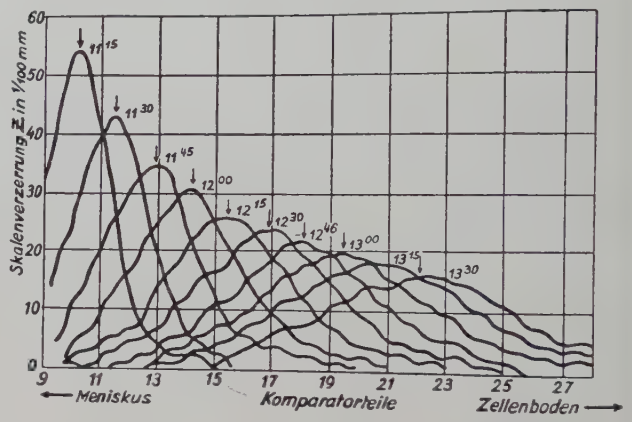



Abb. 6. Sedimentationsdiagramm eines Polystyrols in Methylisopropylketon zu verschiedenen Zeiten nach Beginn der Zentrifugierung[1].

Die Abbildungen 5 bis 7 zeigen 3 Sedimentationsaufnahmen, Abbildung 5 das Diagramm eines molekular einheitlichen Proteins. Die Kurve ist sehr schmal;

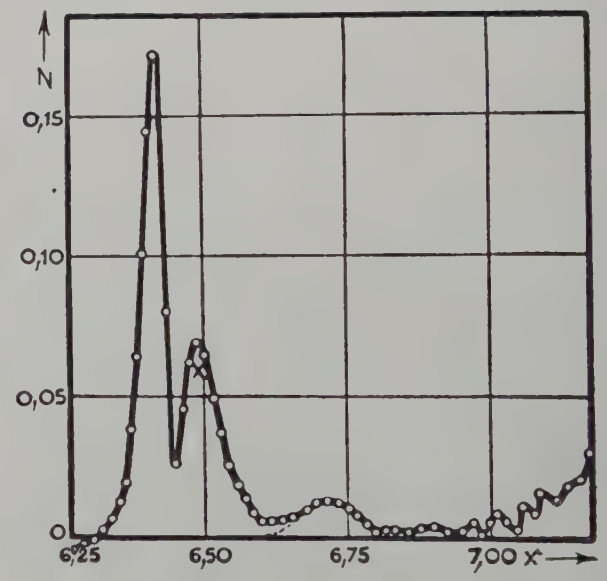



Abb. 7. Sedimentationsdiagramm von menschlichem Serum (paucimolekulares System)[2].

das bedeutet, daß innerhalb einer kleinen Wegstrecke die Konzentration der sedimentierenden Substanz vom

[1] Vgl. The Svedberg und K. O. Pedersen, *Die Ultrazentrifuge* (Steinkopf, Dresden und Leipzig 1940).

[1] J. Hengstenberg und G. V. Schulz, Makromol. Chem. *2*, 5 (1948).

[2] Vgl.: The Svedberg und K. O. Pedersen, *Die Ultrazentrifuge* (Steinkopf, Dresden und Leipzig 1940).

Wert 0 auf den Wert der Anfangskonzentration ansteigt. Während der Sedimentation tritt durch Diffusion eine Verbreiterung der Gradientenkurve ein. In Abbildung 6 sind Sedimentationskurven eines polymolekularen Stoffes dargestellt, welcher Komponenten sehr verschiedenen Molekulargewichtes und damit verschiedener Sedimentationsgeschwindigkeit enthält. Die Gradientenkurve ist dadurch stark verbreitert. Als Maß der Geschwindigkeit verwendet man die Verschiebung des Maximums der Kurve in der Zeiteinheit. Abbildung 7 zeigt ein System, das aus mehreren Komponenten mit stark unterschiedlichen Sedimentationsgeschwindigkeiten besteht, deren jede ein deutliches Maximum hat (Serum)[1].

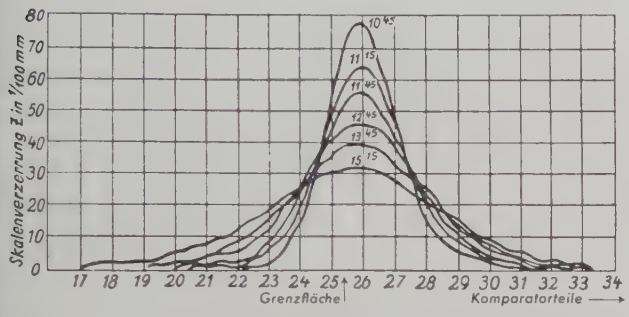



Abb. 8. Diffusionsdiagramm eines Polystyrols in Methylisopropylketon zu verschiedenen Zeiten nach Beginn der Diffusion (die Grenzfläche liegt bei dem Abszissenwert 26)[2].

Rechnet man für einen bestimmten Stoff den $s$-Wert für verschiedene Konzentrationen aus, so erhält man einen Gang. Da die Svedbergsche Gleichung exakt nur für ideale Lösungen gilt, muß man ähnlich wie beim osmotischen Druck den $s$-Wert, der zur Konzentration $O$ gehört, durch Extrapolation ermitteln.

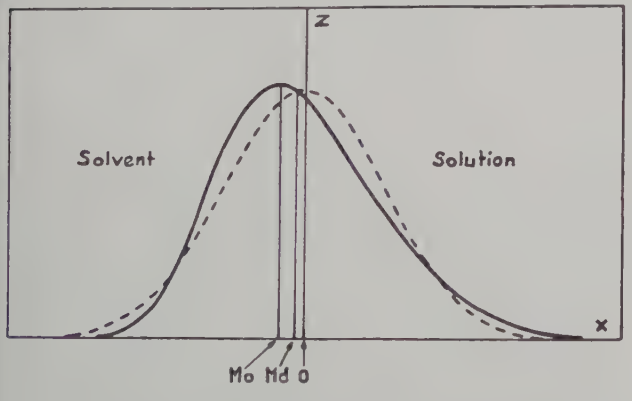



Abb. 9. Schiefes Diffusionsdiagramm einer Zellulose. $O$ ist die Lage der ursprünglichen Grenzfläche, $Md$ = die Flächenhalbierende, $Mo$ der Punkt der maximalen Verzerrung[3].

In den Abbildungen 8 und 9 sind Gradientenkurven von *Diffusionsmessungen* dargestellt. Man erkennt, wie sich die Schicht, in der sich der Konzentrationsausgleich vollzieht, allmählich verbreitert. Für ideale Lösungen ergeben sich Gaussche Fehlerkurven, aus deren Höhe $H$ und Fläche $A$ die Diffusionskonstante nach der Gleichung

$$D = \frac{A^2}{4\pi t H^2} \tag{29}$$

zu berechnen ist. Nichtideale Lösungen sowie solche, die aus mehreren Komponenten bestehen, zeigen Abweichungen von dieser Gestalt. Mathematisch sind diese schwer zu fassen, da sich eine Reihe von Einflüssen überlagern:

1. Die Polymolekularität.
2. Die Abweichung vom van-t'Hoffschen Gesetz, da die treibende Kraft bei der Diffusion der osmotische Druck ist.
3. Die innere Reibung der Lösung, die mit der Konzentration anwächst.

Überwiegt der Einfluß 2, so treten oft schiefe Gradientenkurven auf (Abb. 8). Die unter 2 und 3 genannten Einflüsse lassen sich wieder durch Extrapolation nach der Konzentration $O$ eliminieren. Schwerer ist der unter 1 genannte Einfluß zu erfassen. Bei asymmetrischen Kurven wertet man nach einem Vorschlag von Gralén[1] etwas anders als nach (29) mit der sogenannten Momentenmethode aus, auf die hier nur kurz hingewiesen sei.

Die Frage nach der Durchschnittswertbildung ist bei der hier geschilderten Methode etwas schwierig. Die Art des Durchschnitts hängt stark von der Art der Auswertung ab, wie Jullander[2] in einer ausführlichen Arbeit zeigte. Bei den üblichen Auswertungsverfahren erhält man einen Wert, der nahe beim Gewichtsdurchschnitt (10) liegt. Sehr aussichtsreich erscheint es, aus der Verbreiterung der Sedimentationskurve (vgl. Abb. 6) die Verteilungsfunktion (4) bzw. (6) zu berechnen. Die noch nicht ganz überwundene Schwierigkeit liegt jedoch darin, daß man dann für die Auswertung die Viskosität an jeder Stelle der Zelle kennen muß.

Da die $UZ$-Methode auf anderen Prinzipien beruht als die osmotische Methode, ist ein Vergleich beider Methoden von großem Wert, da hierdurch eine gegenseitige Kontrolle ermöglicht wird. In Tabelle II sind Molekulargewichtsbestimmungen an Proteinen dargestellt. Man sieht, daß die Übereinstimmung recht gut ist. Bei den höhermolekularen Proteinen bestehen allerdings noch Diskrepanzen zwischen beiden Methoden, was wohl daran liegt, daß in den verschiedenen Laboratorien nicht ganz identische Präparate verwendet wurden.

Tabelle III zeigt einen Vergleich an einer Reihe von Polystyrolen. Da die osmotische Methode das mittlere Molekulargewicht, dagegen die Ultrazentrifuge un-

[1] Vgl: The Svedberg und K. O. Pedersen, *Die Ultrazentrifuge* (Steinkopf, Dresden und Leipzig 1940).

[2] J. Hengstenberg und G. V. Schulz, Makromol. Chem. *2*, 5 (1948).

[3] Nils Gralén, Diss. (Uppsala 1944).

[1] Nils Gralén, Diss. (Uppsala 1944).

[2] J. Jullander, Archiv Chem. Mineral. Geol. [A] *21*, 1 (1946).

*Tabelle II*

Molekulargewicht einiger Proteine nach der osmotischen Methode und aus Sedimentation und Diffusion bestimmt[1])

| Protein | Osmotisch | Sedimentation und Diffusion |
|---|---|---|
| Eialbumin . . . . | 40 000–46 000 | 44 000 |
| Pepsin . . . . . | 36 000 | 35 000 |
| Zein . . . . . | 39 000 | 40 000 |
| Hämoglobin (Pferd) | 67 000 | 68 000 |
| Serumalbumin . . . | 73 000 | 70 000 |
| Serumglobulin . . | 174 000 | 167 000 |

gefähr den Gewichtsdurchschnitt liefert, sollten bei polymolekularen Stoffen die *UZ*-Werte über den osmotischen liegen. Die Tabelle zeigt, daß dieses im allgemeinen der Fall ist, wobei die Abweichung – wenigstens annäherungsweise – ein Maß für die Uneinheitlichkeit ist (vgl. auch den Abschnitt VI).

*Tabelle III*

Vergleich der Molekulargewichte von Polystyrolen[2]

| Osmotisches Molekulargewicht | | $M$ aus Sedimentation und Diffusion in Methylisopropylketon |
|---|---|---|
| in Toluol | in Methyl-isopropylketon | |
| 75 000 | – | 103 000 |
| 95 000 | – | 94 000 |
| 178 000 | – | 196 000 |
| 195 000 | 190 000 | 161 000 |
| 192 000 | – | 218 000 |
| 380 000 | 390 000 | 370 000 |
| 443 000 | – | 410 000 |
| 1 150 000 | 870 000 | 1 200 000 |

Die Fehlergrenze der *UZ*-Methode liegt bei einheitlichen Stoffen wohl unter $\pm 5\%$, muß jedoch bei polymolekularen Stoffen wegen der Breite der $s$-Kurven und der Unsicherheiten der Extrapolation auf bis zu $\pm 10\%$ bei unfraktionierten bzw. schlecht fraktionierten Stoffen eingeschätzt werden. Im Gegensatz zur osmotischen Methode ist der Bereich bestimmbarer Molekulargewichte bei der *UZ*-Methode nach oben hin praktisch unbegrenzt. Nach unten zu liegt die Grenze zur Zeit bei etwa 10000. Durch Konstruktion rascher laufender Rotoren könnte er nach unten hin erweitert werden.

## V. *Die Lichtzerstreuungsmethode*

Diese Methode beruht auf der Messung der Intensität, welche das von einer Lösung seitlich gestreute Licht besitzt (Tyndall-Effekt). Diese hängt außer von leicht bestimmbaren physikalischen Konstanten vom Molekulargewicht bzw. der Größe der gelösten Moleküle ab. Die Messung kann photoelektrisch oder optisch, zum Beispiel mit dem Pulfrich-Photometer mit Nephelometeraufsatz der Firma Zeiß, geschehen. Für exakte Messungen baut man letzteres zweckmäßig so um, daß die Beobachtungsrichtung senkrecht auf der Richtung des Primärstrahlers steht[1]. Nutzt man die in diesem Effekt liegenden Möglichkeiten voll aus, so mißt man die Streulichtintensität in Abhängigkeit von der Wellenlänge $\lambda$ (in Lösung) und vom Beobachtungswinkel $\vartheta$ und bestimmt ferner den Einfluß des Polarisationswinkels. Man erhält hierdurch die Möglichkeit, außer der Masse auch die räumlichen Abmessungen der gelösten Teilchen zu bestimmen.

Für Teilchen, die in allen Dimensionen wesentlich kleiner als die Wellenlänge sind ($< 0{,}05\,\lambda$), hat Rayleigh die Theorie gegeben. Der durch die Streuung bedingte Extinktionskoeffizient einer Lösung ist danach

$$\tau = 24\,\pi^3 \left(\frac{n_1^2 - n_0^2}{n_1^2 + 2\,n_0^2}\right)^2 \frac{N V^2}{\lambda^4}, \tag{30}$$

wobei $n_1$ bzw. $n_0$ der Brechungsindex des gelösten Stoffes bzw. des Lösungsmittels ist und sich in 1 cm³ Lösung $N$ einzelne Teilchen mit dem Volumen $V$ befinden. Eine einfache Umrechnung[2] ergibt für das Molekulargewicht die Gleichung

$$M = K_t \frac{\tau}{c} \tag{31}$$

mit

$$\frac{1}{K t} = \frac{24\,\pi^3}{N_L\,\varrho^2\,\lambda^4} \left(\frac{n_1^2 - n_0^2}{n_1^2 + 2 n_0^2}\right)^2, \tag{32}$$

wobei $c$ die Konzentration in g/cm³, $\varrho$ die Dichte und $N_L$ die Loschmidtsche Zahl bedeuten. Debye[3] leitete auf Grund der Schwankungstheorie von Smoluchowski und anderer die formal etwas abweichende Gleichung

$$\frac{\tau}{c} = H\,M \tag{33}$$

ab, wobei

$$H = \frac{32\,\pi^3}{3} \frac{{n_0}^2}{N_L\,\lambda^4} \left(\frac{n - n_0}{c}\right)^2 \tag{34}$$

($n$ = Brechungsindex der Lösung) ist. Es läßt sich leicht zeigen, daß $H = 1/K_t$ ist, wenn der Brechungsindex des Lösungsmittels nur wenig vom Brechungsindex der Lösung abweicht.

Bei Anwendung der obigen Gleichungen hat man sich zunächst zu überzeugen, ob die Moleküle den Voraussetzungen der Rayleighschen Gleichung genügen, das heißt wesentlich kleiner als $\lambda$ sind. Das kann auf zwei Weisen geschehen, indem man entweder nachprüft, ob $\tau \sim 1/\lambda^4$ ist, oder ob die Winkelabhängigkeit der Streuintensität proportional dem Faktor $(1 + \cos^2 \vartheta)$ ist, wie Rayleigh ableitete. Hat man das Zutreffen dieser beiden Bedingungen (oder wenigstens einer von

[1] Nach E. J. Cohn und J. J. Edsale, *Aminoacids, Pepsids and Proteins* (Reinhold, New York 1943).

[2] J. Hengstenberg und G. V. Schulz, Makromol. Chem. *2*, 5 (1948).

[1] R. S. Stein und P. Doty, J. Amer. Chem. Soc. *68*, 159 (1946).

[2] G. V. Schulz, Z. physik. Chem. *194*, 1 (1944).

[3] P. Debye und P. P. Debye, J. appl. Phys. *15*, 338 (1944).

ihnen) sichergestellt, so kann man ohne Bedenken die Gleichungen (30) bis (34) verwenden.

Man hat hierbei allerdings zu berücksichtigen, daß auch die Rayleighschen bzw. Debyeschen Gleichungen nur für ideale Lösungen streng gültig sind. Ist dieses nicht der Fall, so muß man wie bei den anderen hier beschriebenen Methoden den $\tau/c$-Wert nach der Konzentration $O$ zurückextrapolieren (vgl. Abb. 10). Trägt man nun $c/\tau$ gegen die Konzentration auf, so erhält man, wie Debye erstmals zeigte, Geraden, deren Steigung den doppelten Betrag des osmotischen $B$-Wertes hat [vgl. Gl. (18b)].

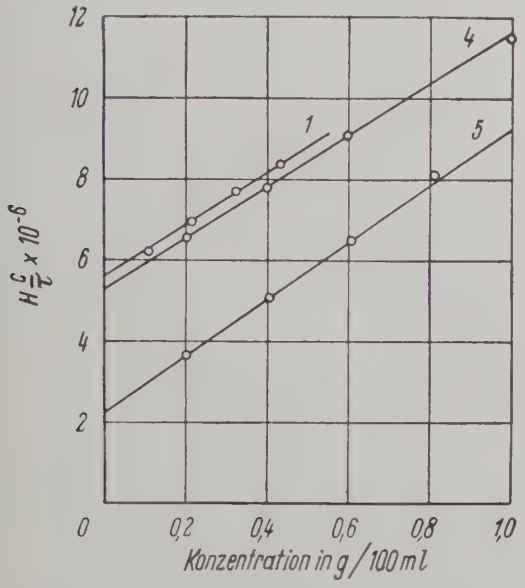



Abb. 10. Lichtstreuung einiger Polystyrollösungen in Methyläthylketon in Abhängigkeit von der Konzentration[1]. Molekulargewichte: (1) 178000, (4) 190000, (5) 445000.

Bei Stoffen mit annähernd kugelförmigen Teilchen (Glykogene und eine größere Anzahl von Proteinen) ist der Anstieg so gering, daß man in mäßigen Konzentrationen die Gleichungen (31) bzw. (33) ohne Extrapolation anwenden kann.

Die zur Auswertung notwendige Konstante $K_t$ bzw. $H$ kann man auf empirische Weise ermitteln, indem man für eine Stoffklasse (zum Beispiel Proteine) die Streuung eines oder mehrerer Vertreter von bekanntem Molekulargewicht mißt. So haben Putzeys und Brosteaux[2] Amandin, dessen Molekulargewicht mit der Ultrazentrifuge bestimmt war, als Standardpräparat verwendet und mit der hierbei erhaltenen Konstante eine Reihe weiterer Molekulargewichte von Proteinen bestimmt. Auf demselben Wege bestimmte Bücher[3] das Molekulargewicht der Enolase. Die Lichtstreuungsmethode wird hierbei als Relativmethode benutzt, wobei ihr voller Wert noch nicht zur Geltung kommt.

[1] P. M. Doty, B. H. Zimm und H. Mark, J. Chem. Phys. *13*, 159 (1945).
[2] P. Putzeys und J. Brosteaux, Trans. Far. Soc. *31*, 1314 (1935).
[3] Th. Bücher, Biochem. biophys. acta *1*, 466, 477 (1947).

Als Absolutmethode benutzte sie erstmals Schulz[1], indem er für Glykogene den $K_t$-Wert nach (32) aus der Dichte und den Brechungsindizes berechnete. Mit Hilfe dieser Konstante konnte er aus den Streuungswerten von Staudinger[2] die Molekulargewichte von Glykogenen direkt berechnen, wobei sich eine überraschend gute Übereinstimmung mit den osmotischen Molekulargewichten ergab (vgl. Tabelle IV). Doty, Zimm und Mark[3] prüften in derselben Weise, fußend auf den Ableitungen von Debye, die Methode an Polystyrolen.

*Tabelle IV*

Vergleich der Molekulargewichte aus Lichtzerstreuung und osmotischem Druck

| Glykogene in Wasser[1] | | Polystyrole in Methyläthylketon[3] | |
|---|---|---|---|
| $M$ (Streuung) | $M$ (osmotisch) | $M$ (Streuung) | $M$ (osmotisch) |
| 450 000 | 440 000 | 95 000 | 100 000 |
| 700 000 | 665 000 | 107 000 | 91 000 |
| 1 400 000 | 1 350 000 | 178 000 | 172 000 |
| 1 700 000 | 1 700 000 | 182 000 | 198 000 |
| 1 800 000 | 1 800 000 | 250 000 | 200 000 |
| 2 200 000 | 2 100 000 | 445 000 | 400 000 |

Sind die räumlichen Abmessungen der Teilchen in einer oder mehreren Dimensionen vergleichbar mit der Wellenlänge, so tritt eine Schwächung des Streulichts gegenüber dem durch die Rayleighsche Gleichung bestimmten Wert ein. Dieser durch eine innermolekulare Interferenz bedingte Effekt nimmt in gesetzmäßiger Weise mit dem Beobachtungswinkel $\vartheta$ zu. Er führt zu zwei beobachtbaren Erscheinungen: Mißt man $\tau$ bei 2 Wellenlängen $\lambda_1$ und $\lambda_2 > \lambda_1$, so ist das «relative Streuverhältnis»

$$\varphi_{\text{rel}} \equiv \frac{\tau_1 \lambda_1^4}{\tau_2 \lambda_2^4} < 1, \tag{35}$$

während es nach der Rayleighschen Gleichung (kleine Teilchen) gleich 1 sein muß[1]. Ferner ist, solange die Rayleighsche Gleichung gilt, die bei verschiedenen Winkeln gemessene Streuintensität symmetrisch zur 90°-Richtung. Bei größeren Teilchen wird die Streuintensität ausgeprägt asymmetrisch, wie Abbildung 11 für Stäbchensole zeigt[4].

Aus der Bestimmung des relativen Streuverhältnisses bzw. des «Unsymmetriekoeffizienten» erhält man einen Korrekturfaktor, der es erlaubt, auch dann Molekulargewichte aus Streulichtmessungen zu bestimmen, wenn die Rayleighsche Gleichung versagt. Ferner ergeben diese Messungen außerordentlich wertvolle Einblicke in die Gestalt der Moleküle. Diese können noch

[1] G. V. Schulz, Z. physik. Chem. *194*, 1 (1944).
[2] H. J. Staudinger und I. Haenel-Immendörfer, J. makromol. Chem. *1* (1943) 185.
[3] P. M. Doty, B. H. Zimm und H. Mark, J. Chem. Phys. *13*, 159 (1945).
[4] G. Oster, P. M. Doty und B. H. Zimm, J. Am. Chem. Soc. *69*, 1193 (1947).

dadurch weiter ausgebaut werden, daß man den Polarisationszustand des Streulichts mißt. Doch würde die ausführliche Besprechung dieser Methodik und ihrer Ergebnisse den Rahmen dieses Artikels überschreiten[1].

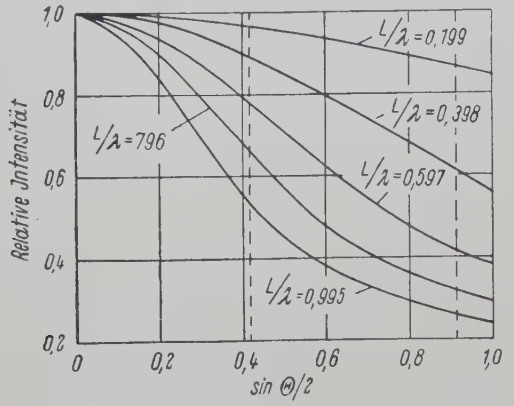



Abb. 11. Abhängigkeit der Streuintensität vom Beobachtungswinkel (0) für Stäbchen verschiedener Länge $L$[2].

Der Anwendungsbereich der Streulichtmethode ist nach großen Molekulargewichten hin praktisch unbegrenzt. Nach kleinen Molekulargewichten hin wird die Methode wegen der abnehmenden Größe des Effekts störanfälliger (zum Beispiel durch optische Unreinheit der Lösungen), so daß die Schwelle 100000 bisher noch selten unterschritten wurde. Der Durchschnittswert, den diese Methode liefert, ist genau gleich dem Gewichtsdurchschnitt (10)[3]. Daher liefert sie bei polymolekularen Stoffen höhere Werte als die osmotische Methode. Aus der Abweichung der mit beiden Methoden erhaltenen Molekulargewichte kann man daher wichtige Aufschlüsse über die Polymolekularität erhalten.

### VI. *Die viskosimetrische Methode*

Diese von Staudinger eingeführte Methode macht sich die Erscheinung zunutze, daß Stoffe mit Fadenmolekülen die Viskosität eines Lösungsmittels, in dem sie aufgelöst sind, schon in verhältnismäßig niedrigen Konzentrationen beträchtlich erhöhen, und zwar um so stärker, je höher ihr Molekulargewicht ist. Die Methode ist nur für Stoffe mit linearen Molekülen anwendbar. Für Proteine, deren Moleküle zu mehr oder weniger globulären Partikeln zusammengefaltet sind, oder Glykogene, deren Moleküle stark verzweigt sind, ist die Methode nicht anwendbar.

Als Maßzahl für das viskosimetrische Verhalten eines Stoffes dient die Viskositätszahl $Z_\eta$ (in der angelsächsischen Literatur als «intrinsic viscosity $[\eta]$» bezeichnet). Sie ist durch den Ausdruck

$$Z_\eta \equiv \lim_{c \to 0} \left( \frac{\eta_{sp}}{c} \right) \tag{36}$$

definiert. Die spezifische Viskosität ergibt sich aus der Viskosität der Lösung ($\eta_L$) und des reinen Lösungsmittels ($\eta_0$) durch die Gleichung

$$\eta_{sp} = \frac{\eta_L - \eta_0}{\eta_0}. \tag{37}$$

Da $\eta_{sp}$ dimensionslos ist, hat $Z_\eta$ die Dimension einer reziproken Konzentration. Die Konzentration $c$ wird in Masse/Volumen gerechnet, wobei das Volumen in $cm^3$, 100 $cm^3$ oder Liter angegeben wird. Es wäre zweckmäßig, sich auf die physikalisch klar definierten Einheiten $cm^3$ (bzw. ml) und Liter zu beschränken.

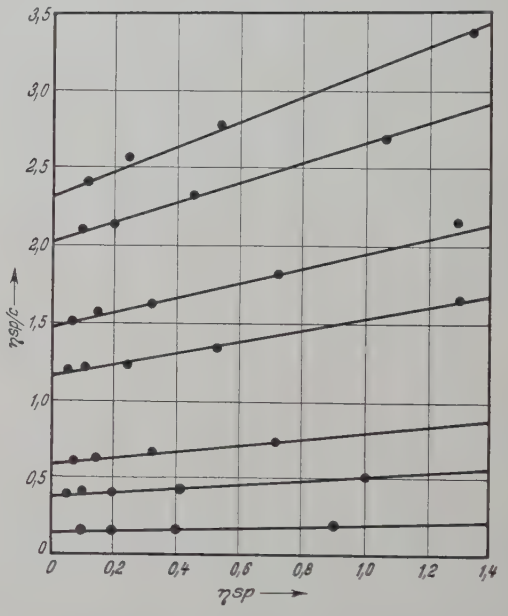



Abb. 12. $\eta_{sp}/c$ gegen $\eta_{sp}$ bei Nitrozellulose verschiedenen Molekulargewichts in Azeton (Schulz und Husemann)[1].

Da für einen gegebenen Stoff in einem bestimmten Lösungsmittel $\eta_{sp}/c$ von der Konzentration abhängt, ist wie bei den anderen Verfahren auch hier eine Extrapolation auf die Konzentration $O$ notwendig. Man macht das am besten graphisch, wobei man eine solche Auftragung wählt, bei welcher möglichst lineare Kurven auftreten. Zwei Verfahren haben sich bewährt, nämlich die Auftragung von $(\log \eta)/c$ gegen $c$, und die Auftragung von $\eta_{sp}/c$ gegen $\eta_{sp}$. Für letztere Auftragung zeigt Abbildung 12 ein Beispiel. Sie scheint sehr allgemein anwendbar zu sein und wird mathematisch in der von Schulz und Blaschke[2] aufgestellten Gleichung

$$\frac{\eta_{sp}}{c} = Z_\eta (1 + K_\eta \, \eta_{sp}) \tag{38}$$

[1] Vgl. hierüber: H. Stuart, Angew. Chem. *62*, 351 (1950).

[2] G. Oster, P. M. Doty und B. H. Zimm, J. Amer. Chem. Soc. *69*, 1193 (1947).

[3] Das gilt allerdings nur für den Bereich, in dem die Rayleighsche Gleichung gilt. Für größere Teilchen verschiebt sich der Durchschnitt in Richtung des Zahlendurchschnitts.

[1] G. V. Schulz und F. Blaschke, J. prakt. Chem. *148*, 136 (1941). – G. V. Schulz und E. Husemann, J. makromol. Chem. *1*, 197 (1943); Z. physik. Chem. [B] *52*, 1 (1942). – G. V. Schulz und G. Sing, J. prakt. Chem. *161*, 161 (1943).

[2] G. V. Schulz und F. Blaschke, J. prakt. Chem. *158*, 136 (1941). – G. V. Schulz, F. Blaschke und E. Husemann, J. makromol. Chem. *1*, 197 (1943); Z. physik. Chem. [B] *52*, 1 (1942). – G. V. Schulz, F. Blaschke und G. Sing, J. prakt. Chem. *161*, 161 (1943).

formuliert, in welcher die Konstante $K_\eta$ meist in der Umgebung des Wertes 0,29 liegt. – Bei der viskosimetrischen Methode ist ferner darauf zu achten, daß $Z_\eta$ vom Lösungsmittel abhängt.

Da die Viskosimetrie eine Relativmethode ist, ist sie nur verwendbar, wenn durch Vergleich mit einer Absolutmethode ein Zusammenhang zwischen Viskositätszahl und Molekulargewicht festgestellt wird. Das ist generell nicht möglich, jedoch zeigt es sich, daß im allgemeinen innerhalb einer polymerhomologen Reihe in einem bestimmten Lösungsmittel jeweils ein eindeutiger Zusammenhang zwischen $Z_\eta$ und $M$ (bzw. $P$) besteht. Um diesen aufzufinden, hat man sich eine Eichkurve herzustellen. Im einfachsten Fall ist der Zusammenhang linear; dann gilt die Gleichung von Staudinger

$$Z_\eta = K_m P. \tag{39}$$

Sehr häufig gilt die Gleichung von Kuhn:

$$Z_\eta = K' P^\alpha \quad \text{bzw.} \quad Z_\eta = K M^\alpha, \tag{40}$$

wie erstmals Houwink[1] an Messungen von Staudinger und Warth[2] nachgewiesen hatte. Auf Grund theoretischer Untersuchungen von Debye, Kirkwood und andern soll der Exponent $\alpha$ noch vom Polymerisationsgrad abhängig sein. Versuche, welche dieses zu bestätigen scheinen, sind aber noch mit einer gewissen Vorsicht aufzunehmen, da sie entweder experimentell nicht ganz ohne Bedenken sind oder an Stoffen aufgestellt wurden, deren Moleküle in undurchsichtiger Weise verzweigt sind, so daß man keine polymerhomologen Reihen im eigentlichen Sinne vor sich hat (zum Beispiel Polystyrole, vielleicht auch Zellulosederivate aus Holz).

Bezüglich der Größe der Molekulargewichte ist die viskosimetrische Methode weder nach oben noch nach unten begrenzt. Bei polymolekularen Stoffen erhält man den Gewichtsdurchschnitt nach (10), wenn die Staudingersche Gleichung gilt. Gilt die Kuhnsche Gleichung, so erhält man einen «viskosimetrischen Durchschnitt»[3], der je nach der Größe des $\alpha$-Wertes mehr oder weniger (jedoch nicht sehr viel) unter dem Gewichtsdurchschnitt liegt.

Da der Verfasser kürzlich eine ausführliche Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse gegeben hat[3], soll hier nur kurz auf Einzelheiten eingegangen sein. Für Polysaccharide bis zum Polymerisationsgrad von etwa 1500 scheint sehr allgemein die Staudingersche Gleichung zu gelten, ferner nach neueren Untersuchungen von Batzer[4] bei Polyoxysäuren bis zum Molekulargewicht von etwa 40000. Für polymere Vinylverbindungen gilt sehr allgemein die Kuhnsche Gleichung mit Exponenten $\alpha$ zwischen 0,6 und 0,8, ebenso für Polyamide bis zum Molekulargewicht 15000. Bei Polystyrolen ist die viskosimetrische Molekulargewichtsbestimmung nur anwendbar, wenn man die Werte laufend mit einer Absolutmethode nachkontrolliert, da sie noch nicht endgültig geklärte Unterschiede in ihrem molekularen Bau (Verzweigungen, Vernetzungen, Knickstellen) haben, die sie zu keiner echten polymerhomologen Reihe machen[1].

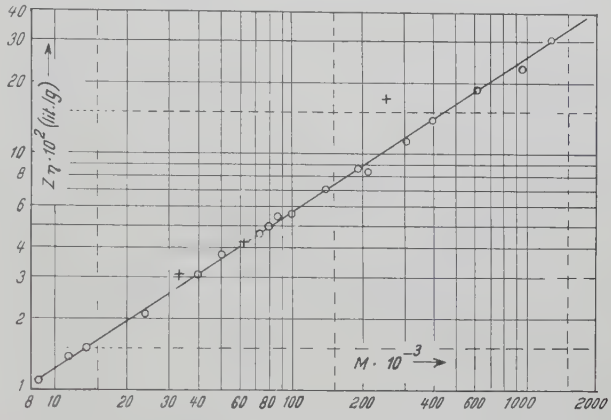



Abb. 13. Viskositätszahl in Abhängigkeit vom osmotisch bestimmten Molekulargewicht bei Polyisobutylon[2] in Diisobutylen.

Zur Erläuterung des Gesagten seien Messungen an zwei polymerhomologen Reihen angeführt, die einen besonders großen Bereich überdecken. Abbildung 13 zeigt eine Meßreihe von Flory[2] an Polyisobutylenen, die sich über einen großen Bereich von Molekulargewichten erstreckt. Hier ist $Z_\eta$ gegen das osmotisch bestimmte Molekulargewicht im doppelt logarithmischen Netz aufgetragen. Bei Gültigkeit der Gleichung (40) erhält man dann entsprechend

$$\log Z_\eta = \log K + \alpha \log M$$

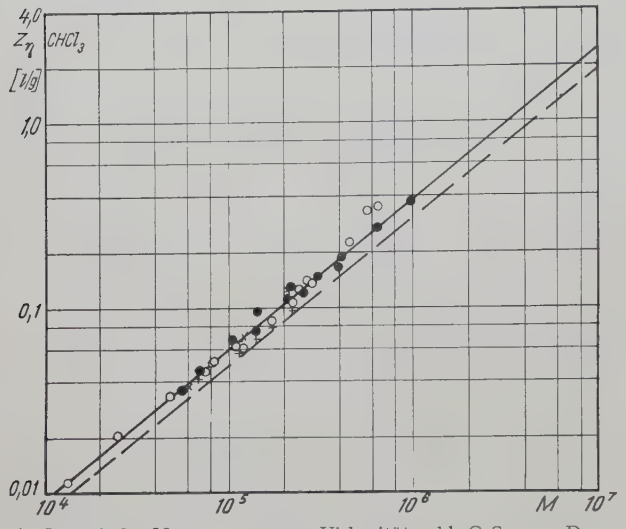
eine Gerade mit der Neigung $\alpha$. Gilt die Staudingersche Gleichung, dann ist die Neigung der Geraden 45°.

Eine Kombination von fünf voneinander ganz unabhängigen Meßreihen an fraktionierten Polymethacrylsäuremethylestern ist in Abbildung 14*a* und *b* dargestellt. Man hat hier einen vollständigen Vergleich aller in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Methoden vor sich. Die obere Kurve enthält osmotische Messungen aus vier verschiedenen Laboratorien, die keine systematische Abweichung voneinander zeigen. Die Streuung beruht zum Teil auf der experimentellen Streuung, zum anderen, wahrscheinlich größeren Teil darauf, daß die Präparate in ihrer molekularen Uneinheitlichkeit verschieden sind (verschieden gut fraktioniert) und daß die Mittelwertbildung – wie oben gezeigt – bei der osmotischen Methode anders als bei der viskosimetrischen ist. In der unteren Kurve sind Lichtzerstreuungsmessungen und solche mit Ultrazentrifuge und Diffusion gegen die Viskositätszahlen aufgetragen. Man sieht, daß die beiden Methoden untereinander recht gut übereinstimmen, jedoch gegen die osmotische eine systematische Abweichung von etwa 15 bis 25% zeigen. Das beruht darauf, daß Lichtzer-

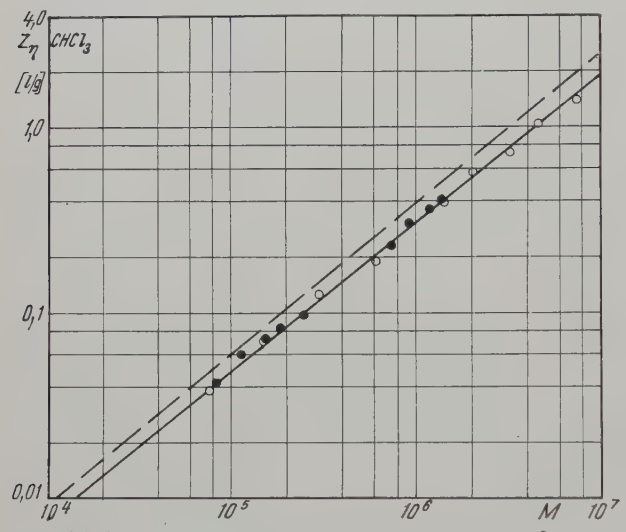
[1] R. Houwink, J. prakt. Chem. *157*, 15 (1940).
[2] H. Staudinger und H. Warth, J. prakt. Chem. *155*, 261 (1940).
[3] G. V. Schulz, Koll. Z. *115*, 90 (1949).
[4] H. Batzer, Makromol. Chem. *5*, 5 (1950).

[1] G. V. Schulz, Makromol. Chem. *3*, 146 (1949).
[2] P. J. Flory, J. Amer. Chem. Soc. *65*, 372 (1943).

streuung und Ultrazentrifuge den Gewichtsdurchschnitt liefern, der bei polymolekularen Stoffen stets höher als der osmotisch bestimmte Mittelwert (Zahlendurchschnitt) ist.




*A.* Osmotische Messungen gegen Viskositätszahl: ○ Schulz-Dinglinger[1]; ● Baxendale[2]; + Bischoff[3]; × Doll (unveröffentlicht).




*B.* Molekulargewichte aus Lichtzerstreuung 0 (Bischoff[3]), sowie Ultrazentrifuge und Diffusion (Meyerhoff[4]) gegen Viskositätszahl.

Abb. 14. Vergleich von 4 Methoden zur Molekulargewichtsbestimmung an Polymethakrylsäure-Methylester.

Die geringere Streuung der unteren Kurve (verglichen mit der osmotischen) ist eine Folge davon, daß Lichtzerstreuung, Ultrazentrifuge und Viskosität annähernd den gleichen Durchschnitt für das Molekulargewicht ergeben, so daß sich die wechselnde Polymolekularität der Präparate auf diese drei Methoden gleichartig auswirkt. Aus der Differenz der beiden Kurven von Abbildung 14 kann man Schlüsse über die Polymolekularität der untersuchten Präparate ziehen. Es ergibt sich hierbei, daß ihre molekulare Uneinheitlichkeit ziemlich erheblich sein muß.

## VII. *Ausblick*

Im Vorangegangenen glaube ich gezeigt zu haben, daß der Forschung heute eine ganze Reihe gut durchgearbeiteter Methoden zur Verfügung steht, um Molekulargewichte bis zu beliebiger Höhe zu bestimmen. Leider klafft zur Zeit noch eine Lücke zwischen den niedermolekularen und den makromolekularen Stoffen: Die Molekulargewichte zwischen 1000 und 10000 machen noch sehr erhebliche Schwierigkeiten. Die kryoskopische Methode führt bei Molekulargewichten über 1000 häufig zu bisher noch nicht aufgeklärten, aber genau reproduzierbaren Fehlresultaten, so daß vor ihrer unkontrollierten Anwendung dringend abgeraten werden muß[1]. Aussichtsreicher erscheint es, die Ebullioskopie und Dampfdruckerniedrigung in den hemikolloiden Bereich hinein weiterzuentwickeln.

Eine weitere Aufgabe besteht darin, die molekulare Verteilungsfunktion polymolekularer Stoffe zu bestimmen. Ein vom Verfasser ausgearbeitetes und viel angewandtes Verfahren der quantitativen Fraktionierung[2] ist leider etwas zeitraubend. Außerdem wäre es gut, die mit ihm gewonnenen Ergebnisse durch eine unabhängige Methode kontrollieren zu können, um schließlich zu ebenso sicheren Ergebnissen zu kommen wie bei der Bestimmung des mittleren bzw. durchschnittlichen Molekulargewichts. Vielleicht wird dieses durch eine Weiterentwicklung der Ultrazentrifugenmethode gelingen.

Die interessanteste Anwendung der hier beschriebenen Methoden geht aber dahin, die Gestalt der Moleküle, ihre innere Beweglichkeit und die energetischen Wechselwirkungen zwischen den Makromolekülen untereinander und mit den Molekülen der Lösungsmittel zu erforschen. Darüber konnten in diesem Bericht nur Andeutungen gemacht werden. Indessen handelt es sich hierbei um ein Forschungsgebiet, dessen Bearbeitung die wichtigsten Aufschlüsse über das physikalisch-chemische und physikalische Verhalten der synthetischen und natürlichen makromolekularen Stoffe zu geben verspricht.

*Summary*

A survey is given of the most important methods for determination of molecular weight (osmotic pressure, ultracentrifuge and diffusion, light scattering, viscosity). All the methods require an extrapolation to zero concentration in order to use equations valid for ideal solutions. Furthermore the polymolecularity of the examined substance must be considered, since each method yields a characteristic average of molecular weight differing from the others. The present limits of the methods are given and their results compared.

[1] G. V. Schulz und A. Dinglinger, J. prakt. Chem. *158*, 137 (1941).

[2] J. H. Baxendale, S. Bywater und M. G. Evans, J. polymer. Sci. *1*, 237 (1946).

[3] J. Bischoff, Diss. (Lüttich 1950).

[4] G. Meyerhoff und G. V. Schulz, Makromol. Chem. *7*, 294 (1951).

[1] H. Staudinger, W. Kern und Ch. d'Herrera, Ber. dtsch. chem. Ges. *68*, 2346 (1935); vgl. auch J. V. Breitenbach und A. J. Renner, Mh. Chem. *81*, 454 (1950).

[2] G. V. Schulz, Z. physik. Chem. [B] *47*, 155 (1940);

# Brèves communications - Kurze Mitteilungen
# Brevi comunicazioni - Brief Reports

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. – Für die kurzen Mitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. – Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. – The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

## On a Polarographic Serum Reaction and its Individual Variations

When serum is deproteinized with sulphosalicylic acid and the filtrate, mixed with an ammoniacal cobalt solution, is polarographed, a catalytic reduction takes place at a potential of – 1·6 V. It is fairly well established that under these conditions a complex is formed between cobalt and degradation products of the proteins of a low molecular weight, e.g. albumoses which are dissolved in the acid. It has been stated, too, that compounds containing sulphur (cystin) are involved in the complex-formation[1]. As the height of the reduction curve increases within certain concentration ranges with the concentration of the degradation products, the curve height is a measure of the amount of such compounds in the serum.

The polarographic cancer reaction is an application of this principle or modifications of it[2]. It was found (Brdička[3]), that curves from cancer serum as well as from other diseases were higher than those from normal serum. Accordingly it would seem possible to use this method as a health control. Because of the overlapping of high normal values and low ones from pathological sera, e.g. from early cases of cancer, some 20% of the polarographic analyses are inconclusive. This renders the usefulness of the method disputable.

In connection with the overlapping of normal and pathological values, the question of the stability of the polarographic blood values of healthy people may be raised. That is: are these values characteristic for the individual, varying but slightly around a mean, or do they show a random distribution? Investigations to that intention were performed on blood donors from the hospital and gave some results of general interest.

The sera of one hundred and four apparently normal persons were analysed. The distribution of the values showed a group of 6 persons clearly within the presumed pathological range (high curves). A second group of 6 persons with very low values was also selected for comparison. The mean values of the corresponding curve heights are given in the Table (test I). These two groups were analysed again after 2 months (II) and 10 months (III). Determinations of protein in the unfractioned sera as well as nitrogen analyses were also performed on the same sera.

As a main result one notes that the property of giving high (low) polarographic curves seems to be a rather individual characteristic. In accordance with the conception of the mechanism of the reaction, this should mean a high (low) amount of cystin in the analysed albumose fraction. Statistical analysis shows that the grouping remains essentially the same, although the shift in the values towards a common mean indicate that slow alterations in the composition of the serum have taken place.

Estimations of the protein by measurements of the refractive index in the whole sera and serum total nitrogen analysis suggests that the polarographic values are not directly dependant on these factors. Thus the individual polarographic differences are not merely a function of a varying serum protein concentration. The nitrogen content of the particular fraction polarographed, i.e. the filtrate after the sulphosalicylic acid treatment, shows, however, a slight correlation between high polarographic curves and a high amount of protein decomposition products. This fact is consistent with the view that at least the cystin content in samples giving high polarographic curves is higher than in the group showing low values. From a practical point of view the results imply that the sera from certain apparently normal persons have polarographic values which fall within the pathological range when analysed for a health control.

A. Forssberg

Institute of Radiophysics, Karolinska Sjukhuset Stockholm, January 5, 1952.

*Zusammenfassung*

Das Polarogramm des Serumverhaltens zeigt bei gesunden Menschen grosse individuelle Schwankungen. Eine Gruppe von Personen lieferte ziemlich konstant andauernd hohe Werte, eine andere hingegen nur niedrige. Diese Unterschiede erwiesen sich als unabhängig von der Totalmenge der Serumproteine und hängen sehr wahrscheinlich von der individuell variierenden Zystin-

[1] R. Brdička, Research *1*, 25 (1947). – R. Winzler and D. Burk, J. Nat. Cancer Inst. *4*, 417 (1944).

[2] R. Brdička, Act. Unio Inter. Contr. Cancer *3*, 13 (1938); Klin. Wschr. *18*, 305 (1939); Acta Radiol. Canc. Bohemiae et Moraviae *2*, 7 (1939). – E. Waldschmidt-Leitz and K. Mayer, Hoppe Seyl. *261*, 1 (1938). – A. Forssberg and S. Nordlander, Acta Radiol. *33*, 165 (1950).

[3] R. Brdička, Research *1*, 25 (1947); Act. Unio Inter. Contr. Cancer *3*, 13 (1938); Klin. Wschr. *18*, 305 (1939); Acta Radiol. Canc. Bohemiae et Moraviae *2*, 7 (1939).

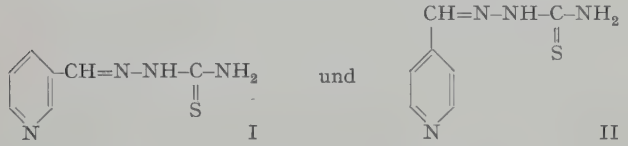
| Test No. | Polarography: Curve height in mm; mean | | P | Refractometry: % protein | | Nitrogen (mg/ml): In total serum | | Nitrogen (mg/ml): In sulphosalicylic acid filtrate | | P |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | High group | Low group | | High group | Low group | High group | Low group | High group | Low group | |
| I | 30·9 | 8·2 | $\leqslant 0{\cdot}001$ | — | — | — | — | — | — | |
| II | 23·5 | 10·3 | $< 0{\cdot}01 \quad > 0{\cdot}001$ | 7·2 | 7·0 | 12·1 | 12·0 | 0·45 | 0·30 | $< 0{\cdot}01 \quad > 0{\cdot}001$ |
| III | 20·4 | 11·7 | 0·001 | 7·3 | 7·3 | 12·1 | 12·2 | 0·46 | 0·33 | $< 0{\cdot}1 \quad > 0{\cdot}05$ |

menge des Serums ab. Wird diese Serumpolarographie zum Beispiel zur Krebsfrühbestimmung verwendet, so besteht die Gefahr, dass die hohen Normalwerte fälschlicherweise als pathologische Zustände diagnostiziert werden.

## Über einige heterozyklische Thiosemicarbazone

Domagk, Behnisch, Mietzsch und Schmidt berichteten in den *Naturwissenschaften*[1] «Über eine neue, gegen Tuberkelbazillen *in vitro* wirksame Verbindungsklasse», die Thiosemicarbazone. Die gleichen Autoren bezeichneten[2] aus einer grossen Zahl untersuchter Benzaldehydthiosemicarbazone das p-Acetylaminobenzaldehydthiosemicarbazon als die beste Verbindung, die in der Folge als Conteben[3] (Tb I/698) in die Therapie der Tuberkulose eingeführt wurde. Angespornt durch diese Arbeiten sind von verschiedenen Forschungsgruppen Versuche unternommen worden, besser wirksame oder ungiftigere Thiosemicarbazone zu synthetisieren.

Wir haben seit 1948 unter anderm Thiosemicarbazone *heterozyklischer* Aldehyde bearbeitet[4]. Wenn wir uns nun entschliessen, unsere bisherigen Befunde über diese Verbindungen bekanntzugeben, bevor eine endgültige Abklärung über die tuberkulostatische Wirkung aller angeführten Präparate erzielt worden ist, so erfolgt dies, weil in der Zwischenzeit unabhängig von uns von anderer Seite[5] über die Herstellung und Wirkung einzelner Verbindungen dieser Körperklasse publiziert worden ist. Die Ergebnisse der zitierten Autoren stimmen mit unsern eigenen Befunden überein. Nach Untersuchungen von Hirsch[6] in unsern chemotherapeutischen Laboratorien erwiesen sich sowohl Pyridin-(3)-aldehyd- und Pyridin-(4)-aldehyd-thiosemicarbazon

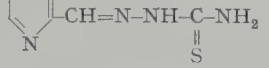



I II

im Tierversuch (experimentelle Mäusetuberkulose) als hochwirksam und dem p-Acetylaminobenzaldehydthiosemicarbazon überlegen.

Währenddem bei den Sulfonamiden die p-Aminobenzolsulfonderivate vieler heterozyklischer Amine sich gegen die verschiedensten Kokkenarten als wirksam erwiesen haben, so kann die Wirkung bei den genannten Thiosemicarbazonen gegen *Mycobacterium tuberculosis* durch kleine Änderungen im Molekül verlorengehen.

So ist das isomere Pyridin-(2)-aldehydthiosemicarbazon




in gleichen Dosen appliziert, wesentlich toxischer als I und II (vgl. auch Grunberg und Leiwant[1]).

Substituiert man in Verbindung I den Thiosemicarbazonrest in 4-Stellung, so geht auch dadurch die Wirkung verloren (zum Beispiel Verbindungen Nr. 4 und 5), wie dies in der aromatischen Reihe bereits früher gezeigt worden ist[2].

Es schien uns richtig, unsere Untersuchungen nicht auf die Abkömmlinge der Pyridinreihe zu beschränken, sondern auch auf Thiosemicarbazone verschiedenster heterozyklischer Aldehyde auszudehnen. Dabei zeigt sich, dass beim Ersetzen des Pyridinkerns in den obigen Formeln durch Furan-[3], Thiophen-[3], Thiazol-, Pyrrol-, N-Methylpyrrol-, Imidazol-Reste (Verbindungen Nr. 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 25, 26, 27) die tuberkulostatische Wirkung gleichfalls verlorengeht. In der folgenden Tabelle sind einige im Rahmen dieser Arbeiten synthetisierte Substanzen aufgezählt. (Früher publizierte Verbindungen sind nur genannt, sofern wir andere Schmelzpunkte gefunden haben.)

R. E. Hagenbach und H. Gysin

Wissenschaftliche Laboratorien der J. R. Geigy AG., Basel, den 18. Februar 1952.

*Summary*

Description of 30 thiosemicarbazones of heterocyclic Aldehydes. Some of these compounds show tuberculostatic activity *in vivo* superior to p-Acetylaminobenzaldehyde-thiosemicarbazone which statement was already made independently by French and American research groups. In the series of heterocyclic thiosemicarbazones very small changes in the molecular structure may cause a total loss of the tuberculostatic properties.

[1] G. Domagk, R. Behnisch, F. Mietzsch und H. Schmidt, Naturwissenschaften *33*, 315 (1946).

[2] G. Domagk, R. Behnisch, F. Mietzsch und H. Schmidt, Angew. Chemie *60*, 113 (1948).

[3] Geschützter Handelsname.

[4] Die Ergebnisse sind in Patentanmeldungen niedergelegt.

[5] C. Levaditi, A. Girard, A. Vaisman und A. Ray, Presse méd. *58*, 1326 (1950); C. r. Acad. Sci. *231*, 1174 (1950); Presse méd. *59*, 213 (1951); C. r. Acad. Sci. Soc. biol. *145*, 60, 861, 864 (1951); C. r. Acad. Sci. *232*, 770 (1951); Presse méd. *59*, 1606 (1951). – E. Grunberg und B. Leiwant, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. *77*, 47 (1951). – Th. S. Gardner, F. A. Smith, E. Wenis und J. Lee, J. org. Chem. *16*, 1121 (1951).

[6] Worüber an anderer Stelle berichtet wird.

[1] C. Levaditi, A. Girard, A. Vaisman und A. Ray, Presse méd. *58*, 1326 (1950); C. r. Acad. Sci. *231*, 1174 (1950); Presse méd. *59*, 213 (1951); C. r. Acad. Sci. Soc. biol. *145*, 60, 861, 864 (1951); C. r. Acad. Sci. *232*, 770 (1951); Presse méd. *59*, 1606 (1951). – E. Grunberg und B. Leiwant, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *77*, 47 (1951). – Th. S. Gardner, F. A. Smith, E. Wenis und J. Lee, J. org. Chem. *16*, 1121 (1951).

[2] G. Domagk, R. Behnisch, F. Mietzsch und H. Schmidt, Angew. Chemie *60*, 113 (1948). – Zum Beispiel E. Hoggarth, A. R. Martin, N. E. Storey und E. H. P. Young, Brit. J. Pharmacol. *4*, 248 (1949). – R. Hirt und H. Hurni, Schweiz. Z. Path. Bakt. *13*, 469 (1950). – R. Donovick und J. Bernstein *et al.*, J. Bact. *59*, 667 und 675 (1950).

[3] Zum Beispiel E. Hoggarth, A. R. Martin, N. E. Storey und E. H. P. Young, Brit. J. Pharmacol. *4*, 248 (1949). – R. Hirt und H. Hurni, Schweiz. Z. Path. Bakt. *13*, 469 (1950). – R. Donovick und J. Bernstein *et al.*, J. Bact. *59*, 667, 675 (1950).

---

NOTEN ZUR TABELLE S. 185

[1] C. Levaditi *et al.*, C. r. Acad. Sci. *231*, 1174 (1950); Smp. 227–230°. – Th. S. Gardner *et al.*, J. org. Chem. *16*, 1121 (1951); Smp. 222–223°.

[2] E. Grunberg und B. Leiwant, Proc. Soc. exp. Med. *77*, 47 (1951), keine Smp.-Angabe.

[3] E. Grunberg *et al.*, l. c.: keine Smp.-Angabe.

[4] J. Bernstein *et al.*, Amer. Soc. *73*, 906 (1951); Smp. 149–150°. – Fl. E. Anderson *et al.*, Amer. Soc. *73*, 4967 (1951); Smp. 152–154°.

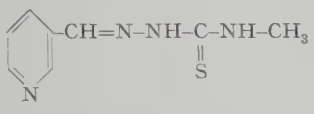
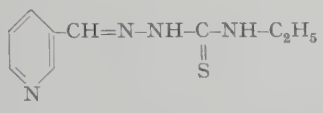
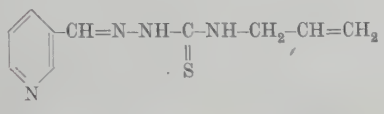
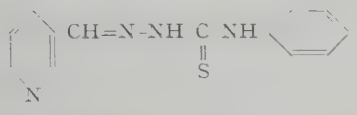
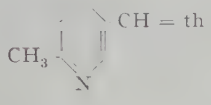
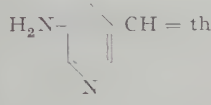
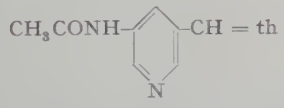
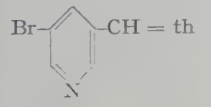
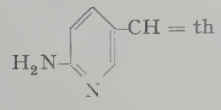
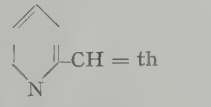
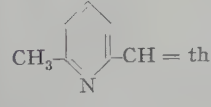
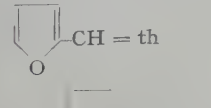
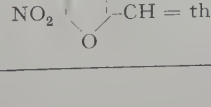
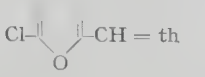
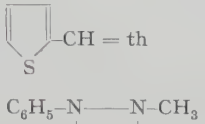
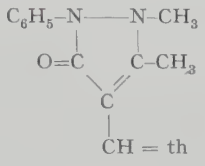
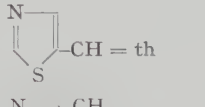
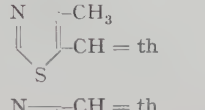
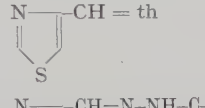
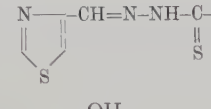
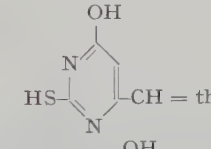
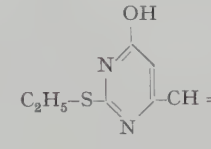
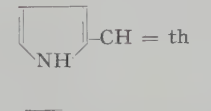
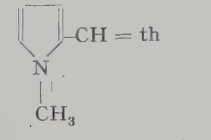
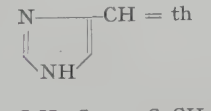
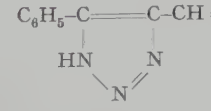
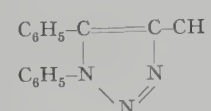
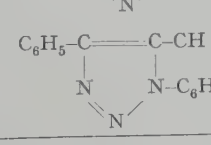
[5] O. Dann *et al.*, Ber. dtsch. Chem. Ges. *82*, 76 (1949); Smp. 229°. – P. P. T. Sah *et al.*, Rec. trav. chim. Pays-Bas *69*, 1545 (1950); Smp. 236–237°. – US. 2416239; allmähliche Zersetzung. – EP. 620888; keine Smp.-Angabe.

[6] J. Bernstein *et al.*, l. c.; Smp. 186–187°. – Fl. E. Anderson *et al.*, l. c.; Smp. 185–186°.

[7] Th. S. Gardner *et al.*, l. c.; Smp. 226–227°.

[8] Fl. E. Anderson *et al.*, l. c.; Smp. 195–197°.

Thiosemicarbazone heterozyklischer Aldehyde

| Nr. | th = =N—NH—C(=S)—NH$_2$ | Schmelzpunkt (unkorrig., auf Kofler-block bestimmt, alle Substanzen schmelzen unter Zersetzung |
|---|---|---|
| 1 | | 222–223° [1] |
| 2 |  | 220–222° |
| 3 |  | 224–226° |
| 4 |  | 181–182° |
| 5 |  | 219–220° |
| 6 |  | 233–234° |
| 7 |  | 224–225° |
| 8 |  | 244–246° |
| 9 |  | 261–263° |
| 10 |  | 219–221° |
| 11 | | 232–234° [2] |
| 12 |  | 210–211° [3] |
| 13 |  | 203–204° |
| 14 |  | 162–163° [4] |
| 15 |  | kein Smp., [5] zersetzt sich allmählich |
| 16 |  | 153–154° |
| 17 |  | 191–192° [6] |
| 18 |  | 240–241° [7] |
| 19 |  | 233–234° |
| 20 |  | 228–230° |
| 21 |  | 189–190° |
| 22 |  | 140–142° |
| 23 |  | kein Smp. bis 380° |
| 24 |  | 260–262° |
| 25 |  | 202–204° [8] |
| 26 |  | 162–163° |
| 27 |  | 207–208° |
| 28 |  | 214–216° |
| 29 |  | 225–226° |
| 30 |  | 239–241° |

## Einfluss von Antikoagulantien auf Zellkernproteine

Neben seiner Wirkung im Blutgerinnungsmechanismus mit mehrfachen Angriffsstellen kommen dem Heparin weitere Eigenschaften zu. Antikomplementwirkung[1], antagonistische Beziehungen zu Hyaluronidase[2], Anwesenheit heparinartiger Substanzen im Magenmucin[3], spezifische Wirkungen auf die Zelle[4] und der temporäre Anstieg des Heparinspiegels im Gefolge des Schocks[5] zeigen die mannigfache Beteiligung dieses Stoffes an Reaktionen des tierischen Organismus. Neuere Beobachtungen an den Zellen der Leber von Ratten haben gezeigt, dass Heparin auf Zellkerne *in vitro* eine auffallende Wirkung ausüben kann[6]. Eigene Untersuchungen mit Antikoagulantien an Suspensionen kernhaltiger Erythrozyten ergeben weitere, nach unserer Meinung interessante Befunde in diesem Zusammenhang.

Ausgehend von sedimentierten, in physiologischer NaCl-Lösung gewaschenen Hühnererythrozyten, lassen sich durch Überführen geringer Mengen des Sedimentes in Heparinlösungen Zellsuspensionen in stark hypotonischem Milieu herstellen. (Zum Beispiel 0,05 cm³ Erythrozytensediment auf 5 cm³ 1‰ige Heparinlösung = 1 %ige Zellsuspension.) Diese Behandlung der Erythrozyten führt nebst der «Lyse» der Zellen zu einer starken Viskositätserhöhung. (Erythrozyten in heparinfreien, hypotonischen NaCl-Medien zeigen diese Erscheinung nicht oder nur andeutungsweise.) Während in Gegenwart von Heparin sowohl in hypo- wie auch in hypertonischem Milieu die Viskositätssteigerung auftritt, bleibt dieser Effekt in isotonischem NaCl-Medium aus. Dies könnte dafür sprechen, dass die Zellen erst in bestimmter Weise geschädigt werden müssen, damit dieser Heparineffekt zustande kommen kann. Viskositätssteigerungen im Gefolge verschiedener anderer, die Hühnererythrozyten aufschliessender Prozeduren sind aus früheren Arbeiten[1] bekannt.

Bei der mikroskopischen Beobachtung (vgl. Abbildungen) erkennt man im Anschluss an die osmotische «Lyse» der Blutkörperchen die Wirkung des Heparins daran, dass die Strukturen im Zellkern verblassen, während gleichzeitig eine allgemeine Quellung sowohl die Zellkerne etwas grösser werden lässt, als auch die Zwischenzellräume ausdehnt. Nicht selten gelingt es, an einzelnen Kernobjekten ein langsames Ausfliessen von Kerninhalt zu beobachten. Extrazellulär finden sich sodann zahlreiche feinste Granula.

Das solchermassen auftretende, die Viskosität bedingende «Material» ist mit Wasser verdünnbar, lässt sich durch Methylgrün[2] anfärben und wird von Desoxyribonuklease abgebaut. (Abgesehen vom Unterschied der Löslichkeit sind diese Eigenschaften ähnlich denjenigen einer gallertigen, in 5 % NaCl-Lösung homogenisierbaren Fraktion, die bei osmotischer Hämolyse von Hühnererythrozyten unter genügend hohem pH [zum Beispiel 9; m/220 $NaHCO_3$] auch ohne Heparinzusatz entsteht.

[1] Literatur nach R. Doerr: *Die Immunitätsforschung*, II. Das Komplement (Springer, Wien 1947), S. 12.

[2] D. Glick und B. Silvén, Science *113*, 388 (1951).

[3] H. Smith, Nature *168*, 563 (1951).

[4] J. R. Warren und F. Graham, J. Bact. *60*, 171 (1950). – L. V. Heilbrunn und W. L. Wilson, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *70*, 179 (1949); Science *112*, 56 (1950).

[5] O. Wilander, Scand. Arch. Physiol. *81*, Suppl. 15 (1938).

[6] H. S. Roberts und N. G. Anderson, Exp. Cell Research *2* (2), 224 (1951). – N. G. Anderson und K. M. Wilbur, J. gen. Physiol. *34* (5), 647 (1951).

[1] G. E. Shattuck, J. gen. Physiol. *12*, 24 (1928). – M. Laskowski, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *49*, 354 (1942).

[2] N. B. Kurnick, Arch. Bioch. *29*, 41 (1951).

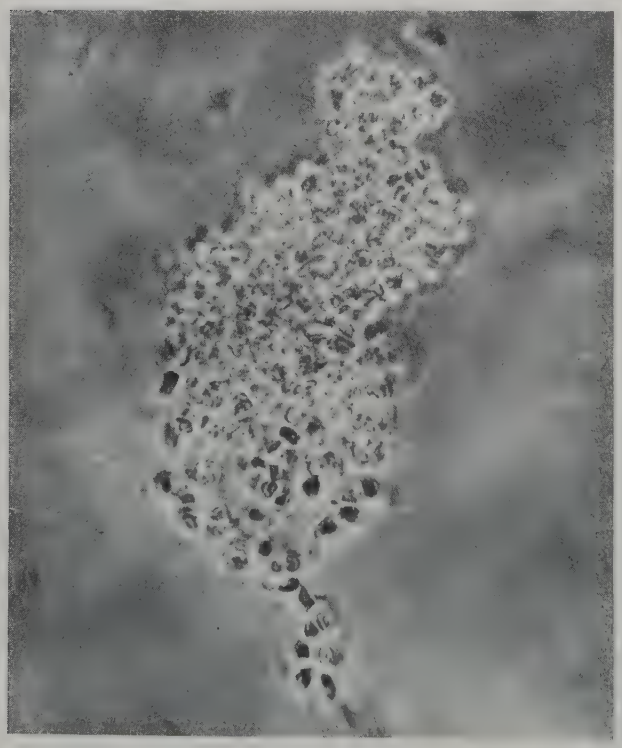


Abb. 1

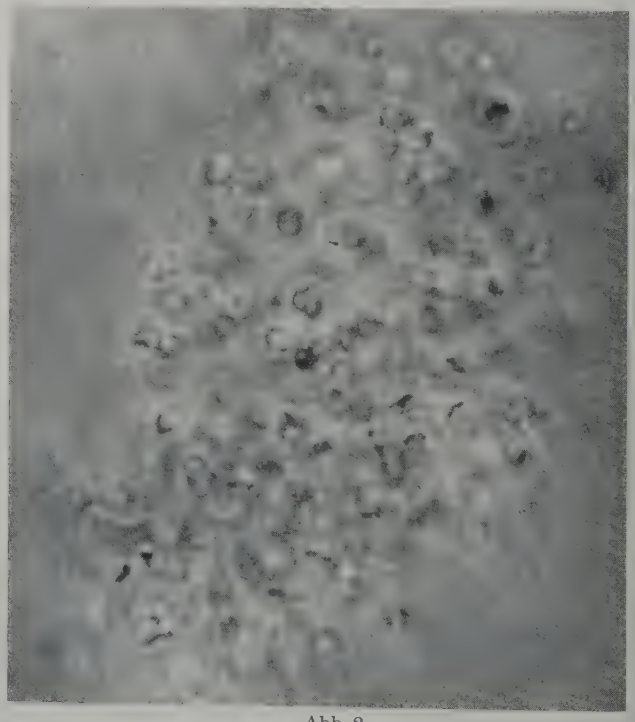


Abb. 2

Dasselbe Konglomerat von Erythrozytenkernen. Abbildung 1 vor, Abbildung 2 bei Heparinkontakt (in $H_2O$ hämolysierte Zellen, in physiologischer NaCl-Lösung aufgeschwemmt). Phasenkontrast-Ölimmersion. Vergrösserung: 700:1.

Gerinnungszeiten der verschiedenen Plasma-Thrombin-Heparin- (bzw. -Erythrolysat-)Gemische
Plasma: Zitrat-Rinderplasma. Variable Heparinzusätze zu konstanter Thrombinmenge (Heparin «Roche»)

| Heparin | Erythrolysat | | | | | | | Heparinmengen verschiedener Verdünnungsstufen der Erythrolysate |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Heparingehalt der Erythrolysate | | | | | | | |
| 1,0 ‰ | 1,0 ‰ | 1,2 ‰ | 1,4 ‰ | 1,8 ‰ | 2,4 ‰ | 3,0 ‰ | 4,0 ‰ | |
| | Gerinnungszeiten in Sekunden (Gerinnungszeit ohne Heparin: 18 s) | | | | | | | |
| 26 | 24 | 25 | 26 | 26 | 25 | 26 | 33 | 0,10 mg |
| 31 | 29 | 29 | 32 | 37 | 35 | 34 | 38 | 0,15 mg |
| 49 | 36 | 41 | 39 | 52 | 46 | 42 | 45 | 0,20 mg |
| 60 | 44 | 47 | 66 | 59 | 61 | 54 | 50 | 0,25 mg |
| >70 | 52 | 60 | 70 | 70 | >70 | 62 | 59 | 0,30 mg |
| | SA-Titer der Erythrolysate | | | | | | | |
| | 16 | 32 | 32 | 128 | 16 | 8 | 4 | |

Die Eigenschaften dieses letzteren «Stoffes» entsprechen denjenigen von Desoxyribonukleaten.)

Das Reaktionsverhältnis Heparin : Zellen : Viskositätssteigerung lässt sich in quantitativer Weise dadurch charakterisieren, dass bei konstanter Zellzahl und variierter Heparinmenge das viskositätsverleihende «Material» bestimmt wird. Zu diesem Zwecke benutzten wir eine Modifikation des ACRA-Testes[1], der bekanntlich auf mehrere hochpolymere Stoffe anwendbar ist. Wir bestimmten den Gehalt an «visköser Fraktion» in den Zellsuspensionen als diejenige Verdünnung, die im Säure-Alkohol-Test (SA-Titer) gerade noch ein zusammenhängendes Häutchen ergab. Wir stellten fest, dass die maximale Ausbeute an hochpolymerisiertem «Material» aus einer gegebenen Zellzahl an eine bestimmte Heparinmenge gebunden ist und dass dabei das Verhältnis der Erythrozyten- zur Heparinkonzentration innerhalb gewisser Grenzen ein konstantes bleibt.

Um Anhaltspunkte über die Reaktionsweise des Heparins bei diesen Vorgängen zu erhalten, prüften wir die gerinnungsverzögernde Wirkung von Erythrolysaten am Plasma-Thrombin-Gemisch im Vergleich zu reinen Heparinlösungen entsprechender Konzentration. (Wir benutzten hiezu im allgemeinen die Technik von Studer und Winterstein[2].) In Erythrolysaten mit gewissem unterschwelligem Heparingehalt ist ein «Heparindefizit» nachweisbar (vgl. Tabelle). Auch in Erythrolysaten von höherer Heparinbeimischung ist eine Verminderung der Heparinaktivität erkennbar, jedoch nur bei den geringeren Verdünnungen des Gemisches. Erythrolysate bestimmter mittlerer Heparingehalte ergeben hingegen den entsprechenden blossen Heparindosen annähernd gleiche Gerinnungszeiten. Erythrolysate dieses Bereiches zeichnen sich ausserdem durch maximale SA-Titer, das heisst durch optimale Ausbeute an «viskösem Material» aus.

Diese Versuchsergebnisse sprechen dafür, dass, abhängig von der Heparinkonzentration, Zellbestandteile in erhöhten Quellzustand geraten und dass dabei Heparin teilweise derart involviert wird, dass dessen Aktivität im Blutgerinnungsmechanismus erniedrigt erscheint. Auffallend bleibt die unterschiedliche Beeinflussung der Heparinaktivität bei niederen, mittleren und hohen Dosen, die dafür sprechen könnte, dass entweder mehrere verschiedene Komponenten oder Reaktionen involviert sind oder dass eine bestimmte, heparinbindende Reaktion einem vom Verhältnis der Reaktionskomponenten abhängigen «Überschuss-Hemmungs-Mechanismus»[1] unterworfen ist. Diese Versuche geben somit keinen eindeutigen Aufschluss über die Reaktionsart des Heparins.

Preliminäre Versuche ergaben ein ähnliches Verhalten auch mit anderen, als Blutgerinnungshemmer bekannten Substanzen, zum Beispiel Germanin und Liquoid Roche. Weitere Untersuchungen mit analogen, aber nicht gerinnungshemmenden Stoffen sollten über die Spezifität der beschriebenen Reaktion Aufschluss geben können.

Fr. Kradolfer

Wissenschaftliche Laboratorien der Ciba Aktiengesellschaft, Basel, den 3. Dezember 1951.

*Summary*

During osmotic hemolysis in the presence of heparin there is a marked increase in the viscosity of the cell suspension, which reaches its maximum only at a certain, fixed ratio of cell quantity to heparin. The increase in viscosity is accompanied by modifications of the structure of the cell nuclei. This process appears to affect the anticoagulant activity of heparin in a certain manner.

[1] K. B. Björnesjö und T. Teorell, Arkiv Kemi, Min. Geol. *19A*, Nr. 34, 12 (1945).

[1] C. L. Oakley und G. H. Warrack, J. Path. Bact. *63* (1), 45 (1951). – F. M. Burnet, Austr. J. exp. Biol. *26*, 71 (1948).

[2] A. Studer und A. Winterstein, Helv. physiol. acta *9*, 6 (1951).

## The Distribution of Carotenoids in the Eggs, Ovaries and Testicles of *Paracentrotus lividus*

Apart from the rôle of carotenoids as provitamins A[1] and their rôle in the visual cycle[2], very little is known of their biological function. The great accumulation of carotenoids in the gonads and eggs of a number of animals has led several workers to suppose that they may play some part in reproduction[1]. In connection with an investigation on the changes of the carotenoid pigments during the development of the sea-urchin *Paracentrotus lividus*[3] a parallel investigation has been undertaken to ascertain the quantitative ratio of the carotenoids in the

[1] T. W. Goodwin, Biol. Rev. *25*, 391 (1950).

[2] G. Wald, The Harvey Lect. Ser. *41*, 117 (1945–46).

[3] A. Monroy, A. Monroy-Oddo, and M. de Nicola, Exp. Cell Res. *2*, 700 (1951).

Spectral maxima and relative percentages of the carotenoids in the extracts.

| | Spectral maxima | Percentages | | |
|---|---|---|---|---|
| | | Testicles | Ovaries | Eggs |
| α+β-Carotene | 445 – 470 | 8·0 | 8·5 | 3·7 |
| Echinenone | 458 | 85·7 | 64·5 | 25·0 |
| Xanthophyll monoester | (370)–(445)– *480* | — | 9·7 | 27·0 |
| Xanthophyll diester | *380* –(470)– *485* | — | 2·8 | 5·4 |
| Xanthophyll 1 | (440)– *450* –(465)–(480) | — | 14·0 | 10·1 |
| Xanthophyll 2 | (430)– *460* –(475) | — | — | 22·0 |
| Xanthophyll 3 (lutein) | (420)– *445* –(470) | 5·9 | — | — |
| Xanthophyll 4 | (400)– *420* –(440) | 0·6 | — | — |
| Xanthophyll 5 | (360)– *385* – *415* – *430* | — | 2·0 | — |
| Xanthophyll 6 | (380)–(400)– *430* | — | — | 5·0 |
| Total extract: testicles | 450 | — | — | — |
| Total extract: ovaries | 450 | — | — | — |
| Total extract: eggs | 475 | — | — | — |
| Ratio xanthophylls/carotenes+echinenone | | 0·005 | 0·37 | 2·4 |
| Ratio total xanthophylls/xanthophyll esters | | — | 2·1 | 2·18 |
| Ratio total xanthophylls/free xanthophylls | | 1·0 | 1·68 | 2·03 |

eggs, egg-free ovaries and testicles of that species. The preliminary results of this investigation will be described briefly in this article. An analysis of the carotenoids of *Paracentrotus lividus* (whole animals), followed by crystallisation of echinenone and pentaxanthine, was already accomplished by Lederer[1]. No mention was made of differences in the distribution of the pigments in the eggs, ovaries and testicles.

The eggs were obtained by shaking the ovaries in seawater and then filtering them through cheese-cloth. After treatment with ethanol, the carotenoids could be extracted first in petrol ether (b.p. 30–50°C) and then with ether. The polar solvents alone do not allow the extraction of any pigment, thus showing that the carotenoids are present in a bound state. The extracts were washed free from alcohol with water, dried with anhydrous Na-sulphate, the solvents evaporated under a stream of $N_2$ and the residue redissolved in petrol ether (total extract). After repeated and careful washings to get rid of eggs and sperm, the same treatment was applied to ovaries and testicles. While the eggs after this treatment were completely colourless, the gonads still retained a pinkish red colour. On slight acidification with diluted HCl, this pigment was easily extracted with ether. Further analysis showed it to be a quinone. The total extract in petrol ether was first separated by phase partition between petrol ether and 90% methanol in free xanthophylls (alcoholic phase) and in carotenes, xanthophyll-esters and echinenone (petrol ether phase)[2].

For the chromatographic separation[3] of the free xanthophylls, $CaCO_3$ was used as adsorbent. For the separation of xanthophyll-esters, carotenes, and cheto-carotenoids (echinenone[4]) a second partition between petrol ether and 90% methanol was accomplished. The alcoholic phase contains xanthophyll-esters and monohydroxyxanthophylls and the petrol ether phase contains carotenes and echinenone. The chromatographic separation was carried out on alumina column and the purification on MgO. Free xanthophylls are retained on the latter, while carotenes and echinenone are extracted with petrol ether and xanthophyll esters with dichlorethane.

The absorption maximum of the total extract, after saponification with methanol-KOH in $N_2$ atmosphere undergoes a change from 475 to 450 mμ. The separated fraction of xanthophyll-esters from eggs undergoes the same change when saponified leaving free xanthophylls. Before being submitted to spectrophotometric analysis, the carotenoid fractions obtained by chromatography were re-chromatographed and whenever possible the identification was confirmed by mixed chromatography.

The quantitative data were obtained by bringing each fraction up to volume, and the relative percentages were calculated on the basis of the readings at the point of maximum absorption in the Beckmann spectrophotometer, reference being made to the total extract.

The data obtained have been summarized in the accompanying Table. α- and β-carotene have been calculated together. They are present in the eggs, egg-free ovaries and testicles. Their relative percentage is the same in testicles and ovaries, but in the eggs only about half of this quantity is found. The relative percentage of echinenone is the highest in the testicles. In the ovaries the percentage is lower by about 25% and this decrease is paralleled by a 25% increase of total xanthophylls. In the eggs echinenone is present to the extent of only 25% of total carotenoids and a further parallel, relative increase of xanthophylls occurs. According to the phase partition[1], mono- and poly-hydroxyxanthophylls are present as free xanthophylls in our material. They have been listed in the Table in the order of increasing polarity. Among these, xanthophyll 3 has been identified as lutein. The identification of the other xanthophylls is in progress. As is shown in the Table, free xanthophylls are different in the testicles, ovaries and eggs, except for one that has been found both in the egg-free ovaries and in

[1] E. Lederer, C. r. Acad. Sci. *201*, 300 (1935); Bull. Soc. Chim. Biol. *20*, 567 (1938).

[2] P. Karrer and E. Jucker, *Carotinoide* (Birkhäuser, Basel, 1948).

[3] R. A. Morton and G. D. Rosen, Bioch. J. *45*, 612 (1949). – H. H. Strain, *Chromatographic adsorption analysis* (Interscience Publ., New York, 1947).

[4] E. Lederer, C. r. Acad. Sci. *201*, 300 (1935); Bull. Soc. Chim. Biol. *20*, 567 (1938). – T. W. Goodwin and S. Srisukh, Bioch. J. *47*, 69 (1950). – T. W. Goodwin and M. M. Taha, Bioch. J. *48*, 513 (1951).

[1] P. Karrer and E. Jucker, *Carotinoide* (Birkhäuser, Basel, 1948).

the eggs. The relative percentage of free xanthophylls is highest in the eggs, then in the ovaries and lastly in the testicles. Xanthophyll-esters are present only in the ovaries and in the eggs. They have been considered as the metabolically less active form of xanthophylls and by analogy with vitamin A as a sort of storage of carotenoids[1]. The ratio of the total xanthophylls to carotenes + echinenone increases in the following order: testicles < ovaries < eggs.

Thanks are due to Dr. A. Monroy and Dr. H. J. Bielig for their suggestions and advice.

Marina De Nicola and Anna Monroy-Oddo[2]

Centre of Biology of the C.N.R. and Department of Physiology of the Zoological Station, Naples, February 8, 1952.

*Zusammenfassung*

Die relativen Mengen der Karotinoide in den Eiern, Ovarien und Hoden von *Paracentrotus lividus* sind verschieden. Qualitative Unterschiede werden in den freien Xanthophyllen gefunden.

[1] T. W. Goodwin, Biol. Rev. *25*, 391 (1950).

[2] Present address: Istituto di Anatomia comparata, Università Palermo.

## Analysis of the *in vitro* Reaction between Jelly-Coat and a Cytoplasmic Component (Antifertilizin[1]) of Sea-Urchin Eggs

The ultracentrifugal isolation from eggs of *Arbacia punctulata* of a cytoplasmic component possessing the properties of Lillie's antifertilizin, has recently been reported[2]. Precipitation of the jelly-coat which surrounds the unfertilized eggs, and prevention of sperm agglutination ordinarily induced by egg-water, are properties of this component. The chemical composition of the active fraction was not investigated, attention being drawn only to its association with the pigment of the egg[2].

The reaction between jelly-coat and "antifertilizin" can be studied conveniently *in vitro*, since mixing egg extract and a solution of jelly-coat results in precipitation. Advantage was taken of this property for further study of the nature and significance of the reaction. Qualitative results of this investigation are reported here; the quantitative aspects will be discussed elsewhere.

Eggs of *Paracentrotus lividus*, *Psammechinus microtuberculatus*, *Sphaerechinus granularis* and *Arbacia lixula* were obtained by shaking the gonads in sea-water or, in the case of the latter two species, also by spontaneous shedding that follows cutting of the shell. The eggs were filtered through cheese-cloth to free them from tissue debris, and washed repeatedly in sea-water. The following operations were carried out in a cold room at 3°C. The jelly-coat solution was prepared by first treating the eggs with acid sea-water and then precipitating the jelly-coat substance by addition of 1·5 volumes of 95% alcohol[3]. After standing 30 minutes, the precipitate was centrifuged down, redissolved in about 6 volumes of distilled water and dialysed against distilled or sea-water. Egg extract was prepared by homogenising the jelly-free eggs in 0·25 *M* sucrose in a Potter-Elvehjem glass-homogenizer. The homogenate was centrifuged at 18,000 × *g* (in a refrigerated centrifuge) and the supernatant centrifuged once more with a distilled water layer on top to rid it of the free fats[1]. The final homogenate was then dialysed against distilled water. The reaction between jelly-coat solution and egg extract was done at room temperature in small test tubes.

The addition of a jelly-coat solution (in distilled or in sea-water) to an egg extract (dialysed against distilled water) of the same species results, as already mentioned, in the formation of a precipitate. Progressively increasing the amount of added jelly-coat solution yields an endpoint, beyond which further addition of jelly-coat solution no longer causes any more precipitate to appear. At this endpoint the U.V. analysis of the supernatant showed a shift in the absorption maximum to 275 m$\mu$ from 260 m$\mu$ in the original egg extract. The $N/P$ ratio in the delipidated precipitate was about 12. While this suggests that nucleoproteins are involved in the precipitation reaction, the possibility of other substances in the egg homogenate cannot be excluded from this reaction with the jelly-coat solution; in fact, it has already been reported that lysozyme and thrombin can give a precipitation reaction with jelly-coat solutions[2]. Preliminary experiments have also shown that incubation of the egg extract with crystalline ribonuclease causes a decrease of about 1/3 in the $N$ and $P$ contents of the precipitate as compared with those obtained when the untreated homogenate is added to the same jelly-coat solution.

Cross-reactions between egg extracts and jelly-coat solutions of the different species have also been studied and the results are given in the accompanying Table. Jelly-coat solutions of *Arbacia*, *Sphaerechinus*, and *Psammechinus* give a strong reaction with egg extracts of all the species investigated, while jelly-coat solutions of *Paracentrotus* consistently failed to react with egg extracts of *Arbacia* and gave a weak reaction with those of *Paracentrotus* itself and of *Psammechinus*.

| Jelly-coat solutions | Egg extracts | | | |
|---|---|---|---|---|
| | *Arbacia* | *Paracentrotus* | *Sphaerechinus* | *Psammechinus* |
| *Arbacia* | + + + | + + + | + + + | + + |
| *Arbacia* + sp. | — | — | — | — |
| *Arbacia* U.V. | — | not tried | — | — |
| *Paracentrotus* | — | + | + + + | — |
| *Paracentrotus* + sp. | — | — | — | — |
| *Paracentrotus* U.V. | — | — | — | — |
| *Sphaerechinus* | + + + | + + + | + + + | + + + |
| *Sphaerechinus* + sp. | — | + | + | — |
| *Sphaerechinus* U.V. | — | — | — | — |
| *Psammechinus* | + + + | + + + | + + + | + + + |
| *Psammechinus* + sp. | — | — | — | — |

+ sp.: jelly-coat solution treated with sperm; U.V.: jelly-coat solution irradiated with ultraviolet rays for 2 hours.

Jelly-coat solutions from all species, except *Sphaerechinus*, when "saturated" with excess of fresh sperm, proved to have lost completely their ability to react with egg extracts; the jelly of *Sphaerechinus* retains, however, some reactivity after such treatment.

For this experiment the following procedure was used. Spontaneously shed sperm was sharply centrifuged in the cold and, after removal of the supernatant sperma-

[1] The designation of this factor as "antifertilizin" seems inadequate. This term may be retained pending further studies.

[2] A. Monroy and J. Runnström, Biol. Bull. *99*, 339 (1950).

[3] A. Tyler, Amer. Natur. *83*, 195 (1949).

[1] A. Monroy and M. de Nicola, Exper. *8*, 29 (1952).

[2] J. Runnström and A. Monroy, Arkiv Kemi *2*, 405 (1950). – A. Monroy and J. Runnström, Biol. Bull. *99*, 339 (1950).

liquor, was thoroughly mixed with jelly-coat solution. After about one minute the suspension was centrifuged and the supernatant tested for its sperm-agglutinating ability. In case this was still present, additional sperm was added and the operation repeated until the jelly-coat solution was inactive against spermatozoa.

It is suggested that those groups in the jelly-coat which agglutinate spermatozoa are the ones responsible for the reaction with "antifertilizin". We are trying to identify these groups. It is known that U.V. irradiation abolishes the sperm-agglutinating ability of jelly-coat solutions[1]. We have found that U.V. irradiation abolishes the precipitation reaction between jelly-coat solution and "antifertilizin", and this may be a further indication of similar or identical groups involved in both reactions.

Evidence has been given for the presence in the cortical layer of the sea-urchin egg of a glycoprotein similar to or identical with the jelly-coat substance[2]. It has also been suggested that this glycoprotein may act as an inhibitor whose removal may be the first step in the activation of the egg[3]. Furthermore the cortical layer of the *Arbacia* egg has been shown to contain also ribonucleic acid[4].

The results presented in this paper give evidence of the formation of complexes between jelly-coat substance and cytoplasmic nucleoproteins. A similar complex may well be present in the cortical layer of the unfertilized sea-urchin egg, the fertilizing spermatozoon being instrumental in breaking it down and thereby liberating the nucleoprotein.

Thanks are due to Dr. L. Kleinholz for the linguistic revision of the manuscript.

P. Dohrn and A. Monroy [5]

Department of Physiology, Zoological Station, Naples, February 8, 1952.

*Zusammenfassung*

Bei der Reaktion zwischen einer Lösung von Gallerthüllensubstanz und Extrakt von Seeigeleiern *in vitro* werden u.a. Nukleoproteine ausgefällt. Die Reaktion wird durch Behandlung der Gallerthüllensubstanz mit Spermatozoen oder durch Ultraviolettbestrahlung aufgehoben.

[1] A. Tyler, Biol. Bull. *81*, 190 (1941). – C. B. Metz, Biol. Bull. *82*, 446 (1942).

[2] L. Monné and D. B. Slautterback, Exper. Cell Res. *1*, 477 (1950).

[3] J. Runnström, Pubbl. Staz. Zool. Napoli, Suppl. *21*, 9 (1949); Adv. Enzymol. *9*, 278 (1949).

[4] A. I. Lansing and T. B. Rosenthal, Biol. Bull. *97*, 263 (1949).

[5] Present address: Istituto di Anatomia comparata, Università di Palermo.

## Action of Capsular Polysaccharide and a Polygalacturonate on the Development and the Virulence of Pneumococcus Type III

It is well known that the virulence of pneumococcus is especially due to the presence of a capsular polysaccharide, specific for every type (S.S.S.). In the case of pneumococcus III, the particular virulence is, according to Wood and Smith[1], related to the presence of an especial "slime layer" of the capsula which interfers notably with surface phagocytosis. The slime layer can be made visible by means of fresh staining with methylene blue which stains it metachromatically. This metachromasia is caused, according to Reeves and Goebel[1], by a high molecular polymer of 4 $\beta$ glucuronosidoglucose.

We have known for some time that some strains of virulent pneumococcus, if cultivated on ordinary media, lose both the capsula and the virulence, passing from the form "S" to the form "R". Among the several ways of restoring the lost virulence, we may mention the simultaneous injection of cultures of capsulated and virulent pneumococci killed by heat (Griffith). This procedure leads to a new virulence and also to the transformation of the type. The substance which provokes this transformation seems, according to the studies of Mac Carthy Avery and Mac Leod[2], to be a desoxyribonucleid acid.

A certain action upon the degree of virulence of the germ seems also to be exercised by the same S.S.S. Morris and Kerr[3] have in researches on immunity noted an augmentation of the pathogenic action on mice of pneumococcus III sensibilized with the homologous S.S.S.

In these preliminary experiments, I have made virulent some pneumococcus III strains by addition of a small quantity of S.S.S. III to the culture media. I have made use of three strains of pneumococcus III, of different origin, which were already virulent for the mouse, I have indicated them respectively by the abbrevations: BG42; ML47; TR49. The BG42 strain had been preserved by passing through broth T; the ML47 strain by drying *in vacuo*; the TR49 on desiccated spleen of a infected mouse. All these strains were found by biological test to have lost their virulence completely; and they showed on selective media (blood-agar, serum-agar, etc.) colonies of pneumococcus in the "R" form which when inoculated intraperitoneally into small white mice, even in large quantity, never caused the death of animal.

Nor was it possible to restore the virulence of the strains after several passing in mice: while the injection together with the Proteus which provoked a putrid peritonitis resulting in the death of the animals, did not allow me to separate a pneumococcus which was virulent in successive inoculations.

However the colonies, which have developed on culture media in the presence of blood or serum, have shown themselves to be of "R" form and not made up of encapsulated elements.

The addition of 0·5 mg of S.S.S. III[4] to every tube of broth with addition of ascitic fluid made it possible starting from the original strains, to obtain the pneumococci in capsulate form. Inoculation into mice confirmed the virulence with a high percentage of deaths from septicemia. In some case I also had the production of inflammatory pulmonary lesion with hepatization.

In order to control the behaviour of the capsular slime layer of the virulent pneumococcus III, I used fresh staining with alkaline methylene blue up to 1%. With such a method the pneumococci without capsules are immediately stained an intense blue, due to rapid diffusion of the stain into the body of the microbe, while the slime-covered organisms take the stain more slowly and feebly, making it possible to assume a more or less evident metachromasia. Generally a greater degree of metachromasia corresponds to a higher virulence of the microbe.

In order to ensure if the virulence which I obtained with addition to culture medium of S.S.S. III, should

[1] W. B. Wood jr. and M. R. Smith, J. Exp. Med. *90*, 85 (1949).

[1] R. E. Reeves and W. F. Goebel, J. Biol. Chem. *139*, 511 (1941).

[2] O. Avery, C. Mac Leod, and M. Mac Carty, J. Exp. Med. *79*, 137 (1944). – M. Mac Carty and O. Avery, J. Exp. Med. *83*, *89*, and *97*, 104 (1946). – M. Mac Carty, Bact. Rev. *10*, 63 (1946).

[3] M. Morris and H. Kerr, J. Immunol. *52*, 301 (1946).

[4] Kindly offered by "Lederle Comp.", N. Y.

*Table I*

| Strain | Number of inoculated mice | Dead after hours | | | | | Living after 72 hours |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 12 | 24 | 36 | 48 | 72 | |
| BG42 | 10 | — | 2 | 3 | 2 | — | 3 |
| ML47 | 5 | — | — | 2 | 1 | 1 | 1 |
| TR49 | 10 | 1 | 2 | 3 | 3 | — | 1 |
| Total | 25 | 1 | 4 | 8 | 6 | 1 | 5 |

be considered a very specific phenomenon, or if it were possible to reproduce it by putting the germ into conditions of utilising substances chemically analogous to capsular S.S.S., I tasted the activity of *pectines*, which are very similar in chemical structure to the S.S.S. of the pneumococcus. For the introduction of pectines as culture media, already suggested by FUNCK[1] as a substitute for agar, a practical application has not yet been found. I then prepared a pectine culture medium, adding to the ordinary agar up to 2% (fused in the water-bath), a colloidal solution of *polygalacturonate* of Ca to 6%, in the measure of 2 $cm^3$ for every tube of agar, and then allowed it to solidify.

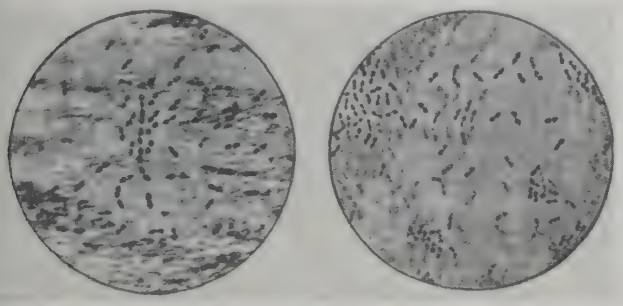


Fig.1.–Pneumococci type III methylene blue fresh staining. On the left: broth culture with ascitic fluid and specific polysaccharide. On the right: ordinary agar with polygalacturonate culture.

Such a medium looks homogeneous and transparent; the avirulent strains of pneumococcus stroke-inoculated produced many colonies of "S" form, with a tendency to flow together in abundant growth of creamy aspect. The growth appeared maximally after 48 hours incubation, and its luxuriant aspect compared well with that obtained with other culture media used before. The pneumococci in such a culture showed capsula and presented metachromatic reaction. When injected into mice, it produced death by sepsis in many animals.

A certain number of mice, however, were able to survive the infection, probably due to some individual resistence. If a certain quantity of polygalacturonate of Ca in solution up to 6% (0·5 or 1 $cm^3$ for a mouse of 20–30 g) is injected some days later into these surviving mice, it is possible to determine in some of them death due to pneumococcal septicemia, while the injection of the same quantity of polygalacturonate is tolerated by normal mice without apparent disturbances.

The polygalacturonate therefore seems to exert an action on the pneumococcus's III virulence, whether *in vitro* or *in vivo*.

Luxuriant and virulent growths are obtained equally if, instead of simple nutrient agar for preparation of the polygalacturonate-medium, agar with addition of serum or ascitic fluid is used.

A frequent characteristic of pneumococci growths in polygalacturonate-agar is a loss of the agar-transparency corresponding to the colonies, so that after removal of these, an exact impression of the growth may persist in the medium. The phenomenon is probably in connection with phenomena of an oxydative nature. It has long been known by MAC LEOD and GORDON[1], PAULI[2] and PLATT[3], that the pneumococcus during its increase is able to give rise to peroxide of hydrogen. The opacity of the agar is reproduceable by oxidation with $H_2O_2$ and can be modified by addition of ascorbic acid. Pneumococci type III, cultivated on ascorbic acid-polygalacturonate-agar, have shown a marked metachromasia to methylene blue. Such a metachromasia is observed only in colonies which are first developed, and it seems to decrease noticeably with further development of the growth.

This phenomenon, which is worthy of further investigation, could be brought into relationship with the observation of ROBERTSON, ROPES and BAUER[4] on the degrading action of pectine by the $H_2O_2$-ascorbic acid system. This on the other hand, may exert a destructive action upon various pneumococci capsules, so that we could hypothetically assume that at first the pneumococcus without capsule utilizes more easily the products of degradation of pectine for the synthesis of its own capsular S.S.S., and is afterwards exposed in to turn to the degrading activity of the above-mentioned oxide-reductive system.

[1] E. FUNCK, Klin. Wschr. *16*, 1546 (1937).

[1] C. MAC LEOD and M. H. GORDON, J. Path. Bact. *26*, 127 (1914).
[2] P. PAULI, Boll. I. S. M. *6*, 225 (1927).
[3] B. S. PLATT, Biochem. J. *21*, 19 (1927).
[4] B. W. v. ROBERTSON, M. W. ROPES, and W. BAUER, Biochem. J. *35*, 903 (1941).

*Table II*

| Strain | Number of inoculated mice | Dead after hours | | | | | Living after 72 hours |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 12 | 24 | 36 | 48 | 72 | |
| BG42 | 10 | — | 1 | 3 | 2 | — | 4 |
| ML47 | 10 | — | — | 2 | 4 | — | 4 |
| TR49 | 10 | — | 2 | 1 | 3 | 1 | 3 |
| Total | 30 | — | 3 | 6 | 9 | 1 | 11 |

*Conclusion:* (1) The addition of S.S.S. to the culture media can restore the virulent character of strains of pneumococcus III which have long ago lost their pathogenetic power.

(2) The addition of polygalacturonate of Ca to nutrient agar, with or without addition of serum or ascitic fluid, gives an excellent medium of culture for the pneumococcus, which increases there luxuriantly in "S" form, capsulated and virulent.

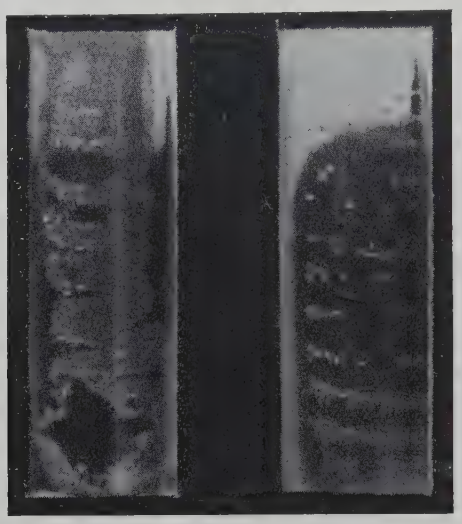


Fig. 2.–Culture of pneumococcus III on polygalacturonate-agar (on the left) compared with normal culture on serum-agar.

(3) The injection of polygalacturonate into mice infected by pneumococcus III, increased its pathogenic power, while it did not produce evident toxic effects in normal mice.

(4) The growth of pneumococcus III on polygalacturonate-agar may show a modification of transparency of the medium, presumably in relation to phenomena of oxydative nature.

(5) The addition of ascorbic acid to the polygalacturonate-agar appears primarily to facilitate, and then to inhibit the development of elements with capsular metachromasia.

A. Novelli

Department of General Pathology and Bacteriology, University of Genoa, November 15, 1951.

*Zusammenfassung*

Durch Züchtung nicht-pathogener Pneumokokkenstämme in Gegenwart von spezifischen Polysacchariden wurden diese für weisse Mäuse virulent. Ein besonders günstiges Medium für die Entwicklung von Pneumokokken wurde bei der Prüfung von Pektinstoffen auf Nährböden gefunden, wenn man nämlich den gewöhnlichen Agarkulturröhrchen 2 $cm^3$ einer kolloidalen Lösung von 6prozentigem Polygalakturonat des Ca zusetzte. Auf diesem Nährboden entwickeln sich die Pneumokokken (III) in reichem Masse, sowohl in eingekapselter wie auch in virulenter Form.

## Amino Acid Requirements for Growth of the Honeybee (*Apis mellifica* L.) [1]

In a previous communication[2] it was shown that a normal growth of the young worker honeybee, determined by the estimation of dry weight and nitrogen content, could be obtained on a semi-synthetic diet of sucrose and casein at a temperature of 30° C. The natural diet of sucrose and bee bread (pollen) was used for comparison. Now we have obtained this growth of the newly emerged imago on a totally synthetic diet. The casein of the former investigation being replaced by a mixture of 17 amino acids, based on the composition of casein[3]. The dicarboxylic acids of casein, i.e. glutamic- and aspartic acid, were omitted from the mixture after it had been shown that a casein hydrolysate from which these amino acids had been quantitatively removed with the ion exchange resin Amberlite I.R. 4*B*, could replace the casein. (A full account of these findings will be published elsewhere.) From the amino acid mixture each component was omitted in turn and the dry weight and nitrogen content of the bees was determined at 7 days intervals. In this way we were able to investigate the significance of each of the amino acids for the protein anabolism of the young honeybee.

*Material and methods.*–In September–November 1951 young bees were caught from a comb with sealed brood which was placed in an incubator at ± 33° C. The newly emerged bees were taken at intervals of 8 hours and transmitted into Liebefelder experimental cages. These little cages, with 50 bees in each, were kept at 30° C and constantly supplied with water and with the experimental diet. The latter consisted of sucrose, tap water and mixtures of 17 or 16 pure amino acids (Hoffmann-La Roche[4]) in the same relative amounts as in casein. *l*-Amino acids were used, except methionine, threonine and serine, the latter being only available in the *dl*-form. No vitamins were added to the diet. The amino acids were fed at such a level that the normal nitrogen content of an adult bee could be obtained in about 14 days. This occurs if the amino acid mixture amounts to 2·5 % of the dry sugar. The amino-acids are added to the sugar-water mixture (4:1) and the whole is heated for some minutes to dissolve the sugar. After cooling the mixture is stirred with a glass rod. In this way a very finely crystallised sugar candy is obtained in which the amino acids are dissolved or divided homogeneously.

Dry weights and nitrogen contents were determined of newly emerged bees, and of bees after having been fed for 7 and 14 days on the experimental diets. For each determination a sample of 5 bees was used, after removing the digestive tract, with honey stomach and excretory organs included.

The dry weight was determined by keeping the samples for 3 days in an incubator at 80° C. Nitrogen determinations were performed according to Kjeldahl, with sulphuric acid, potassium sulphate and selenium mixture (Wieninger) for destruction, and 0·1 *n* solutions of sulphuric acid and sodium hydroxyde for titration. For further details see [5] and [6].

[1] 54th Communication of the "Werkgemeenschap voor Veeteeltkundige Onderzoekingen" part of the "National Council for Agricultural Research, T.N.O.".

[2] A. P. de Groot, Proc. Kon. Ned. Akad. Wetensch. *53*, 560 (1950).

[3] R. J. Block and D. Bolling, *The amino acid composition of proteins and foods*, 2nd Ed. (Springfield, 1951), p. 490.

[4] Our thanks are due to F. Hoffmann-La Roche and Co. for their kindness in supplying the amino acids.

[5] A. P. de Groot, Proc. Kon. Ned. Akad. Wetensch. *53*, 560 (1950).

[6] A. P. de Groot and J. C. A. Mighorst, Chem. Weekbl. *47*, 219 (1951).

*Results and discussion.* The data of the dry weights and nitrogen determinations are plotted against time in the figures 1 and 2. Each point of these graphs is the average of 4 or 5 samples of 5 bees. The amino acid omitted is mentioned next to the curve belonging to the corresponding diet. The curve marked with "complete" shows the increase on a diet with 17 amino acids i.e. those of casein except glutamic and aspartic acid.

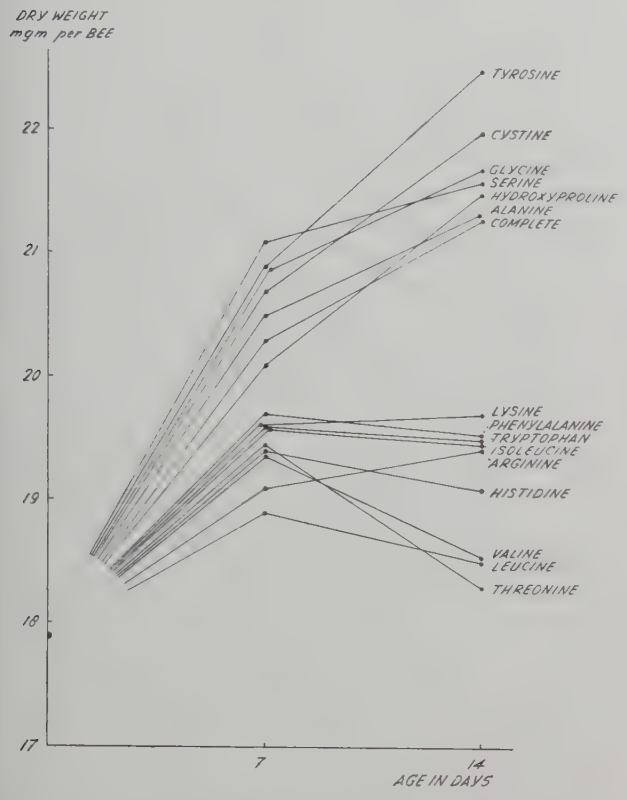



Fig. 1.–Increase in dry weight of young honeybees on diets in which the amino acid mentioned near each curve had been omitted. Determinations on whole bees without digestive tracts.

Both of the graphs show two clearly separated groups of curves. The increase of the lower group after 14 days being about 5%, that of the upper group about 20% of the original value of newly emerged bees. The difference between both groups is most marked in their course between the 7th and the 14th day. In this period the increase in dry weight and nitrogen content is nearly absent in the lower group, whereas in the upper group a steep rise occurs. Since in the adult bee under natural conditions the dry weight and nitrogen content amounts to 21–23 mg and 2·5–2·7 mg respectively, it may be noted from the graphs that on the experimental diets of the upper group the normal values may be attained.

From these findings it may be concluded that the lower group of curves includes the diets deficient in an essential amino acid, whereas in the upper group amino acids are lacking which are dispensable to the honeybee imago.

Summarizing these results it may be stated that the following amino acids are essential for the growth of the young worker honeybee: arginine, histidine, lysine, phenylalanine, tryptophan, leucine, isoleucine, threonine and valine. Dispensable amino acids are: glycine, alanine, serine, cystine, tyrosine, hydroxyproline, glutamic acid and aspartic acid. The significance of methionine and proline could not yet be estimated with certainty since the curves concerned showed a somewhat intermediary course. It seems, however, that methionine is essential and proline is not. The position of these amino acids will therefore be further investigated[1].

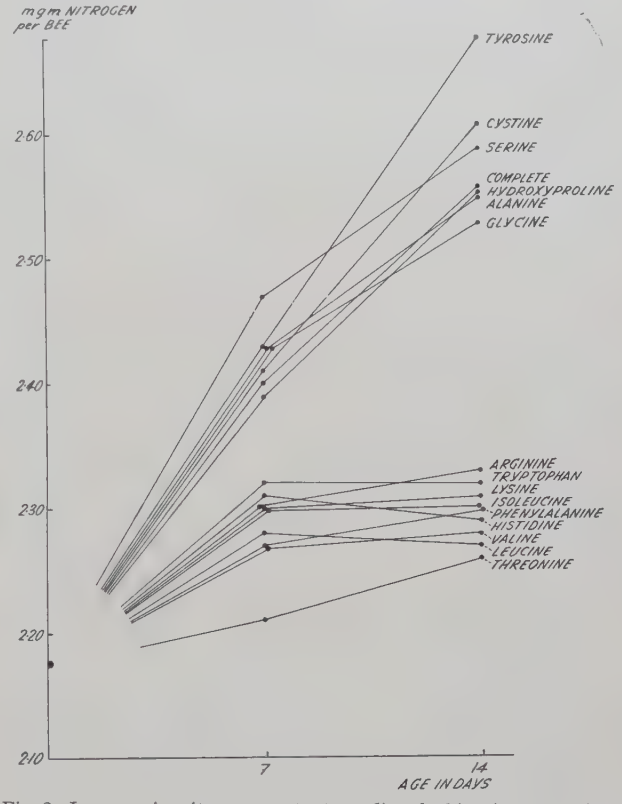



Fig. 2.–Increase in nitrogen content on diets lacking in one amino acid.

It is interesting to note the close resemblance in the amino acid requirements of the imago honeybee with those of the higher animals, especially the rat. So far as has been investigated up to now, there is no difference in the requirements of the growing rat[2] and the growing honeybee. However, some marked deviations occur in the needs of *Aedes aegypti*[3]. This insect, which has so far been the most extensively investigated, needs glycine for larval growth, whereas for the growth of the honeybee imago glycine is dispensable. On the other hand phenylalanine is essential for the honeybee, but seems to be replacable by tyrosin in this mosquito.

In the present investigation the natural *l*-amino acids have been used except for the racemic mixtures already mentioned. In further experiments it will be investigated how far the *d*-amino acids can replace the natural *l*-forms.

Acknowledgment: The author is indebted to Prof. S. Dijkgraaf for the facilities provided in his laboratory. Thanks are also due to Dr. C. G. J. M. Engel for frequent help and advice and for the correction of this manuscript, and to Miss L. Bowey, London, for the correction of the English text.

A. P. de Groot

Laboratory of Comparative Physiology, University of Utrecht, January 3, 1952.

[1] While the manuscript was in press the essential nature of menthionine could be established, whereas proline turned out to be non-essential.

[2] W. C. Rose, Physiol. Rev. *18*, 109 (1938).

[3] L. Goldberg and B. de Meillon, Biochem. J. *43*, 379 (1948).

*Zusammenfassung*

Zur Aufklärung des Bedarfs an Aminosäuren frisch geschlüpfter Jungbienen wurde die Zunahme ihres Trokkengewichtes und Stickstoffgehalts bestimmt, bei Verfütterung von Diäten, welche anstatt Eiweiss ein Gemisch aus 17 Aminosäuren enthielten. Durch wechselweises Fortlassen je einer der 17 Aminosäuren konnte gezeigt werden, dass für gutes Wachstum die folgenden Aminosäuren notwendig sind: Arginin, Histidin, Lysin, Phenylalanin, Tryptophan, Leuzin, Isoleuzin, Methionin, Threonin und Valin. Nicht notwendig waren: Glykokoll, Alanin, Serin, Zystin, Tyrosin, Prolin, Oxyprolin, Glutaminsäure und Asparaginsäure.

## Die Entstehung sterischer Nachbilder

Bekanntlich lassen sich durch längere beidäugige Fixation entsprechend heller körperlicher Objekte sterisch erscheinende Nachbilder gewinnen. Diese Art der Nachbilder ist insofern eine besondere, als hiebei das funktionelle Zusammenwirken beider Netzhäute im Sinne von Einfachsehen Voraussetzung ist, wobei dasselbe durch die binokulare Parallaxe des gebotenen körperlichen Objektes mit einer besonderen Qualität der Empfindung bzw. Wahrnehmung verknüpft ist, nämlich der nach der Tiefe.

Wie für das beidäugige Einfachsehen, liegen auch für das körperliche Sehen besondere zentral-nervöse Bedingungen vor: Die beiderseitigen Optikusleitungen, welche die Netzhauterregungen von Orten abführen, die im Sinne von Einfachsehen, beziehungsweise Tiefensehen gekoppelt sind, laufen in der Sehrinde einer Hemisphäre zusammen, wobei es zwischen diesen Leitungen keine subkortikalen Verbindungen gibt. Hinzu kommt noch, dass es eine fixe Zuordnung der Rezeptoreinheiten der beiderseitigen Retinae im Sinne von Korrespondenz (Plansehen), beziehungsweise binokularer Parallaxe oder Querdisparation (Stereosehen) nicht geben kann. Dies beweist die Feinheit der stereoskopischen Unterschiedsempfindlichkeit einerseits, die Grössenordnung der während Fixation bestehenden Lageänderungen der Augen (sogenannten Fixationsschwankungen) andererseits. Während erstere einen Wert von 5 Winkelsekunden erreicht, beträgt letztere 4 bis 6 Winkelminuten. Hieraus ergibt sich, dass die Auswertung der binokularen Parallaxe bei feinen Objekten nicht auf Grund der Bilderzeugung auf der lichtempfindlichen Schicht erfolgen kann, sondern nur auf Grund bestimmter nervöser Impulsmuster, welche sowohl retinal wie erst zerebral entstehen können.

In Anbetracht dieser Verhältnisse ist die Frage der Entstehung sterischer Nachbilder von grundsätzlicher Bedeutung. In Betracht kommt eine retinale sowie eine zentral-nervöse, also kortikale Genese. Die Frage kann experimentell entschieden werden, da ja nach Gewinnung eines entsprechend hellen sterischen Nachbildes ein Auge reversibel ein- und ausgeschaltet werden kann, und zwar durch Steigerung des Innendruckes.

*Methodik:* Die sterischen Nachbilder wurden gewonnen durch freiäugige Vereinigung stereoskopischer Halbbilder eines Pyramidenstumpfes, deren Konturen in Leuchtlinien entsprechender Helligkeit dargestellt waren. Bei diesem Vorgehen sind neben dem körperlich erscheinenden Sammelbild zwei plane Doppelbilder sichtbar, welche den subjektiven Vergleich zwischen den sterischen und nichtsterischen Nachbildern erleichtern. Die Beobachtung erfolgte im Dunkelraum, die temporäre Ausschaltung eines Auges durch fortschreitend starken Fingerdruck. Die Versuche wurden an zwei VPn durchgeführt.

*Ergebnisse:* Aus den Versuchsreihen seien nur folgende Versuchsprotokolle angeführt:

Gute Nachbilder. Sterischer Eindruck des zentral gelegenen Nachbildes; links und rechts davon undeutliche, schwache und immer nur für kurze Zeit erscheinende Nachbilder der Doppelbilder. Alle Nachbilder nur deutlich bei offenen Augen. Auf Abdrücken des rechten Bulbus verschwindet der sterische Eindruck und es erscheint das plane Nachbild des linken Auges. – Neuerliche Fixation des binokularen Sammelbildes. Abdrücken links: sterischer Eindruck verschwindet, planes Nachbild des rechten Auges. Nach Freigabe Wiederkehr des sterischen Nachbildes.

Gute Nachbilder. Abdrücken rechts: sterischer Eindruck verschwindet, Nachbild des linken Bildes der Vorlage und des rechten Doppelbildes (i.e. Nachbilder des linken Auges). Nach Freigabe Wiederkehr des sterischen Eindruckes. Abdrücken links: Verschwinden des sterischen Eindruckes, Nachbild des rechten Bildes der Vorlage und deutliches Nachbild des linken Doppelbildes (Nachbilder des rechten Auges). Die Nachbilder der Doppelbilder sind im Vergleich zu dem des binokularen Sammelbildes vor dem Abdrücken immer flüchtiger – jeweils nur für Bruchteile von Sekunden sichtbar – und undeutlicher. Kurze Zeit nach Beginn des Abdrückens erscheinen sie in den meisten Fällen viel deutlicher als vorher und bleiben länger bestehen; manchmal erreichen sie fast die Helligkeit des binokularen Sammelbildes.

Zusammenfassend ergibt sich eindeutig, dass bei temporärer Erblindung eines Auges mit dem Schwinden des diesem zugehörigen Nachbildes auch der sterische Charakter des binokularen Sammelbildes erlischt, der mit Wiederkehr der Funktion des ausgeschalteten Auges wieder deutlich hervortritt. Die sterischen Nachbilder sind also peripheren, das heisst retinalen Ursprunges.

F. X. Wohlzogen

Physiologisches Institut der Universität Wien, den 22. Dezember 1950.

*Summary*

The behaviour of stereoscopic after-images was studied under conditions of temporary blindness of one eye (effected by artificially raising the intraocular pressure).

From these experiments it became evident that temporary blindness of one eye, and consequent disappearance of the respective after-image, also resulted in the cessation of the stereoscopic character of the binocular combination-image which, however, reappeared on release of the pressure and consequent return of the function of the temporarily eliminated eye. Therefore, the origin of stereoscopic after-images is a peripheral, i.e. retinal, one.

## L'influence des hormones cortico-surrénaliennes sur la régénération de l'épithélium cornéen du lapin; les problèmes statistiques que posent ces expériences

Plusieurs auteurs (Ragan et collaborateurs[1], Taubenhaus et Amromin[2], Creditor et collaborateurs[3], Baker

[1] C. Ragan, E. L. Howes, C. M. Plotz, K. Meyer et J. W. Blunt, Proc. Soc. Exp. Biol Med. *72*, 718 (1949).

[2] D. Taubenhaus et G. D. Amromin, Endocrinology *44*, 359 (1949).

[3] M. C. Creditor, M. Bevans, W. L. Mundy et C. Ragan, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. *74*, 245 (1950).

et WHITAKER[1], BAXTER et collaborateurs[2]) ont établi une action inhibitrice de la Cortisone et de l'ACTH sur la granulation réparatrice des tissus. KÖHLER et SCHARF[3], ainsi que LÉOPOLD et collaborateurs[4], sont parvenus à démontrer ce phénomène sur l'épithélium cornéen du lapin. En plus KÖHLER et SCHARF ont cru pouvoir mettre en évidence une action trophique de la désoxycorticostérone sur ce même tissu. Des observations correspondantes ont été signalées auparavant par KÖHLER et collaborateurs 1942[5], 1949[6], 1950[7], ACKERMANN[8], au cours du traitement de l'ulcère gastrique.

KÖHLER et SCHARF font une abrasion de la cornée du lapin à l'aide d'un trépan de 4 mm de diamètre. Ils contrôlent les progrès de l'épithélisation en instillant de la fluorescéine. Le traitement: Cortisone 2,5%, ACTH 0,5%, désoxycorticostérone 0,5%, en instillation toutes les heures. KÖHLER et SCHARF obtiennent une accélération de l'épithélisation de 9 h pour la désoxycorticostérone, ceci par rapport aux témoins, alors que l'ACTH et la Cortisone retardent l'épithélisation respectivement de plus de 9 et 12 h.

Cette expérience n'est pas seulement intéressante du point de vue biologique et statistique, mais aussi de première utilité en clinique. Nous nous sommes donc proposés de répéter l'expérience de KÖHLER et SCHARF. Notre technique diffère peu de la leur. Les lapins sont anesthésiés à l'éther; l'abrasion se fait au centre d'une surface circulaire de 5 mm de diamètre, tracée à l'aide du trépan de Franceschetti. Les yeux témoins reçoivent une solution de sérum physiologique; les 2e et 3e groupes une suspension de désoxycorticostérone à 1 et à 5%; le 4e groupe est traité avec une suspension de Cortisone à 2,5%. Les contrôles d'épithélisation se font à l'aide de la lampe à fente de Haag et Streit, en colorant, si besoin est, les érosions avec de la fluorescéine. La cornée est considérée comme épithélisée quand il n'y a plus coloration.

*Plan des expériences.* Les méthodes de l'organisation des expériences introduites par R. A. FISHER[9] permettent de choisir un plan d'expérimentation efficace dans la plupart des cas. Le schéma approprié à notre problème est celui dit: «balanced incomplete bloc designs». YATES[1] en a donné une description et une méthode d'analyse correcte.

On peut supposer, et l'expérience le confirme, que les deux yeux d'un lapin se ressemblent davantage que les yeux de deux lapins quelconques. Il est donc préférable de comparer l'effet de la Cortisone et de la desoxycorticostérone en appliquant ces substances aux yeux d'un même lapin, afin de diminuer le plus possible l'erreur expérimentale. Il faut admettre au préalable que la substance appliquée à l'œil gauche n'agit pas sur l'œil droit, et vice-versa. Les résultats de nos expériences sont suggestifs à cet égard. Lorsqu'on étudie l'influence de la Cortisone, de la desoxycorticostérone à 1 et à 5% et qu'on les compare à un traitement témoin (sérum physiologique), on ne peut administrer à un lapin que deux de ces traitements. Pris deux à deux, il y a six combinaisons possibles parmi les quatre traitements en question. On arrive à l'arrangement suivant, si on répète trois fois chacune de ces combinaisons (en même temps, nous indiquons les durées d'épithélisation en heures).

L'observation de l'œil droit du lapin n° 12 manque à la suite d'une faute de technique opératoire qui a lésé le parenchyme cornéen.

*Graphique 1: Résultats des expériences*

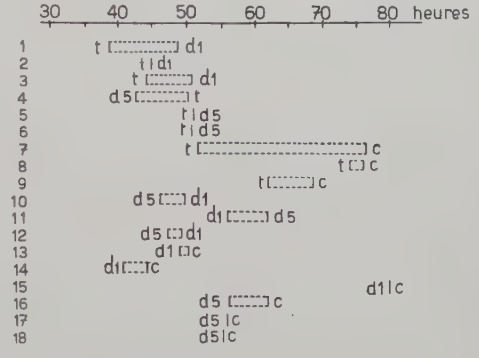



Fig. 1. – Durée de la régénération de l'épithélium cornéen au niveau des yeux de 18 lapins ($t$ = témoin, $c$ = cortisone 2,5%, $d_1$ et $d_5$ = désoxycorticostérone à 1 et à 5%).

*Analyse des expériences.* Il ne suffit pas d'organiser l'expérience avantageusement, il faut encore l'analyser correctement. Or le graphique n° 1 nous apprend que la durée d'épithélisation varie sensiblement d'un lapin à l'autre; une illustration frappante en est fournie par les

[1] B. L. BAKER et W. L. WHITAKER, Endocrinology *46*, 544 (1950).
[2] H. BAXTER, C. SCHILLER, J. WHITESIDE et R. E. STRAITH, Plastic Reconstr. Surgery *7*, 24 (1951). – H. BAXTER, C. SCHILLER et J. H. WHITESIDE, Plastic Reconstr. Surgery *7*, 85 (1951).
[3] V. KÖHLER et J. SCHARF, Klin. Wschr. *29*, 324 (1951).
[4] J. H. LEOPOLD, J. E. PURNELL, E. J. CANNON, C. G. STEINMETZ et P. R. MACDONALD, Amer. J. Opht. *34*, 361 (1951).
[5] V. KÖHLER et A. FLECKENSTEIN, Dtsch. Med. Wschr. *1*, 19 (1942); Wien. Med. Wschr. *94*, 286 (1944).
[6] V. KÖHLER, Endokrinologie *26*, 34 (1949).
[7] V. KÖHLER, J. SCHARF et R. BAUER, Endokrinologie *27*, 127 (1950).
[8] W. ACKERMANN, 1er Congr. Europ. de Gastro-entérologie, Lausanne, 22–25 juillet 1948.
[9] R. A. FISHER, *The design of experiments*, 4th ed. (Oliver and Boyd, Edinburgh 1947).

[1] F. YATES, Ann. Eug. *7*, 121 (1936).

Résultats de l'expérience

| Lapin | Traitements | | Lapin | Traitements | | Lapin | Traitements | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | $t$ 38,5 | $d_1$ 49,0 | 2 | $t$ 44,5 | $d_1$ 44,5 | 3 | $t$ 44,0 | $d_1$ 51,0 |
| 4 | $t$ 50,5 | $d_5$ 42,5 | 5 | $t$ 51,0 | $d_5$ 51,0 | 6 | $t$ 50,5 | $d_5$ 50,5 |
| 7 | $t$ 51,5 | $c$ 76,5 | 8 | $t$ 74,0 | $c$ 76,0 | 9 | $t$ 62,0 | $c$ 69,0 |
| 10 | $d_1$ 50,0 | $d_5$ 46,0 | 11 | $d_1$ 56 | $d_5$ 62,0 | 12 | $d_1$ 49,5 | $d_5$ ? |
| 13 | $d_1$ 49,0 | $c$ 50,5 | 14 | $d_1$ 40,5 | $c$ 44,5 | 15 | $d_1$ 80,0 | $c$ 80,0 |
| 16 | $d_5$ 56,0 | $c$ 62,0 | 17 | $d_5$ 56,0 | $c$ 56,0 | 18 | $d_5$ 55,5 | $c$ 55,5 |

$t$ = témoin; $d_1$ = désoxycorticostérone 1%; $c$ = Cortisone; $d_5$ = désoxycorticostérone 5%

lapins 13, 14 et 15, tous trois traités de la même façon, mais dont les durées d'épithélisation varient du simple au double. Malgré cette forte variation individuelle, les mêmes lapins nous indiquent que la Cortisone prolonge la durée d'épithélisation plus que ne le fait la désoxycorticostérone à 1 %.

Lorsqu'une observation manque, il faut la remplacer, faute de quoi, l'analyse serait compliquée de beaucoup. On peut soit répéter l'expérience sur un nouveau lapin, soit remplacer la valeur manquante par un calcul indiqué par Cornish[1]. On obtient pour le lapin 12 et le traitement $d_5$, d'après la formule de Cornish, une durée d'épithélisation estimée à 47 ¼ h.

*Graphique 2: Résultats de l'analyse statistique*

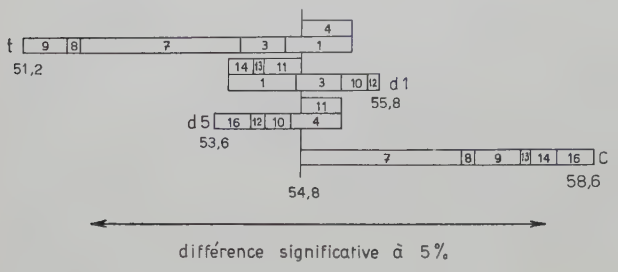



Fig. 2.

Le graphique 2 résume la méthode que nous avons utilisée et les résultats auxquels elle conduit; on obtient les durées d'épithélisation pour les traitements.

| *Traitement* | *Moyenne* |
|---|---|
| Témoin . . . . . | 51,2 |
| Désoxycorticostérone 5 % . . . . | 53,6 |
| Désoxycorticostérone 1 % . . . . | 55,8 |
| Cortisone à 2,5 % . . . . . | 58,6 |

Il importe encore de juger si les durées moyennes d'épithélisation diffèrent significativement entre elles. En utilisant la méthode de Yates[2], qui est aussi décrite dans le traité de Cochran et Cox[3], on trouve que les moyennes des témoins et des yeux traités à la Cortisone diffèrent significativement à un seuil de probabilité de 5 %. La différence entre les témoins et la désoxycorticostérone 5 %, dans le sens d'une prolongation du temps d'épithélisation n'est pas significative, mais elle se trouve très peu en dessous de la limite de signification à 5 %.

*Conclusions.* Les données qui viennent d'être exposées plus haut confirment nos connaissances sur l'action inhibitrice de la Cortisone sur la granulation des tissus. Par contre, les résultats obtenus à l'aide d'une suspension de désoxycorticostérone tant à 5 qu'à 1 % sont en opposition avec les conclusions de Köhler et Scharf, puisque nos résultats parlent plutôt pour une prolongation du temps d'épithélisation par cette substance.

Soulignons que la planification de notre expérience, telle qu'elle a été exposée ci-dessus, est d'une très grande précision, grâce à la comparaison des traitements qui se fait entre les yeux des mêmes lapins. L'un de nous a calculé que le gain en précision peut être évalué à environ 560 %, ce qui vient à dire que si on voulait faire l'expérience avec la même précision en comparant les traitements effectués sur les yeux appartenant à des lapins *différents*, il faudrait utiliser environ 240 yeux (théoriquement 237) au lieu de 36, comme nous l'avons fait.

J. B. Bourquin et A. Linder

Laboratoire de la clinique ophtalmologique et Laboratoire de statistique mathématique de l'Université de Genève, le 3 janvier 1952.

*Summary*

After performing an abrasion of the rabbit's cornea (5 mm), the authors studied the action of a suspension in physiological serum of desoxycorticosterone 1 and 5 % and Cortisone 2·5 % on the epithelial regeneration of the cornea. The "test cornea" received physiological serum.

The experiments were laid out in a so-called "balanced incomplete bloc design". With such a planning of the experiments, there is an increase in precision which is estimated to be of 560 %.

Epithelisation times are:

51·2 hours for the test cornea which received physiological serum;

53·6 for desoxycorticosterone 5 %;

55·8 for desoxycorticosterone 1 %;

58·6 for Cortisone 2·5 %.

## Activation thyréotrope des urines du cobaye par la rupture de l'équilibre thymus-thyroïde-gonades

Il a été relaté précédemment[1] que chez le cobaye une excrétion accrue du facteur thyréotrope peut être déterminée par l'extirpation du thymus, de la thyroïde ou des gonades ou bien de deux de ces glandes à la fois; d'autre part, que l'extirpation des trois n'a montré aucune influence sur l'activité thyréotrope des urines. Ces observations ont suggéré l'hypothèse que c'est la rupture de l'équilibre thymus-thyroïde-gonades qui a déterminé l'activation thyréotrope de l'hypophyse. (Dans plusieurs expériences précédentes, cette notion de l'équilibre thymus-thyroïde-gonades a été rencontrée[2]).

*Tableau I*

| Lot de cobayes donneurs N° | Degré d'activation de la thyroïde des jeunes cobayes après l'injection d'urine de cobayes thymi-thyréoprives castrés traités par des injections d'hormones | |
|---|---|---|
| | 3 × 6 cm³ d'urine | 3 × 9 cm³ d'urine |
| I | + + | + + |
| II | + + | + + + |
| III | + ou + + | + + |
| IV | 0 | ± ou +*) |
| V | + + ou + + + | + + + |
| VI | 0 ou ± | +*) |
| VII | 0 | 0 ou ± |

*) A considérer comme douteux (cf. Junkmann et Schoeller), car la vérification (effet intense par le double de la dose) est impossible; de plus, peut se rencontrer chez le cobaye normal.

[1] E. A. Cornish, Ann. Eug. *10*, 112 (1940).

[2] F. Yates, Ann. Eug. *7*, 121 (1936).

[3] W. G. Cochran et G. M. Cox, *Experimental designs* (John Wiley & Sons, New-York 1950).

[1] J. Comsa, C. r. Acad. Sci. *232*, 1245 (1951); Ann. Endocrin. *12*, 565 (1951); *12* (1951) (sous presse).

[2] J. Comsa, R. Canad. biol. *7*, 615 (1948) (bibliographie); C. r. Acad. Sci. *228*, 2065 (1949); Bull. Soc. chim. biol. *31*, 1035 (1949); Amer. J. physiol. *166*, 550 (1951).

*Tableau II*

Incidence des mutilations du groupe thymus-thyroïde-gonades sur l'activité thyréotrope des urines du cobaye

| Opération | Activité thyréotrope | Reproduit chez le castrat thymi-thyréoprive par l'injection de: | Résultat |
|---|---|---|---|
| thymectomie | passagèrement accrue | thyroxine + testostérone | superposable au thymiprive récent |
| castration | passagèrement accrue | thymus + thyroxine | superposable au castrat ancien |
| castration + thymectomie | durablement accrue | thyroxine | superposable |
| thyroïdectomie | légèrement accrue | thymus + testostérone | superposable |
| thymectomie + thyroïdectomie | accrue | testostérone | superposable |
| thyroïdectomie + castration | accrue, si la thyroïdectomie est faite en second lieu | thymus | superposable |

Pour vérifier cette hypothèse, il a été tenté de rompre cet équilibre chez le cobaye thymi-thyréoprive par des injections d'une ou de plusieurs hormones du groupe thymus-thyroïde-gonades et de rechercher les conséquences de cette rupture sur l'activité thyréotrope des urines.

*Expérience.* Cobayes mâles, thymi-thyréoprives castrés. Après vérifications de l'activité thyréotrope nulle de leurs urines.

Le lot I reçoit 3 injections de thyroxine espacées de 24 h (13 $\gamma$ pour 100 g de poids vif par injection).

Le lot II reçoit dans les mêmes conditions l'extrait thymique B.C. 25, à raison de 13 unités-cobaye par 100 g de poids vif par injection.

Le lot III reçoit dans les mêmes conditions 250 $\gamma$ de propionaté de testostérone pour 100 g de poids vif.

Le lot IV reçoit à la fois la thyroxine et l'extrait de thymus (13 $\gamma$ de thyroxine, 13 U.C. d'extrait).

Le lot V reçoit à la fois la thyroxine et la testostérone.

Le lot VI à la fois la testostérone et l'extrait de thymus.

Le lot VII reçoit les trois préparations à la fois.

24 h après la dernière injection, les urines des animaux sont recueillies individuellement pendant 48 h, complétées à 25 cm³ pour 100 g de poids vif du donneur, filtrées, lavées à l'éther, injectées à des cobayes mâles de 150 g environ, trois jours de suite, à raison de 6 et 9 cm³ par injection. Les thyroïdes des animaux sont prélevées 24 h après la dernière injection et examinées d'après la méthode de Junkmann et Schoeller[1]. Les résultats sont réunis dans le tableau I.

On peut en déduire que le cobaye thymi-thyréoprive castré excrète des quantités accrues de facteur thyréotrope à la suite des injections de thyroxine, d'extrait de thymus, de testostérone ou de thyroxine et testostérone.

L'injection simultanée de testostérone et d'extrait de thymus donne un résultat douteux. Enfin, l'injection simultanée de thyroxine et d'extrait de thymus ou des trois préparations à la fois n'a pas d'effet décelable sur l'excrétion du facteur thyréotrope.

La posologie de ces préparations dans l'expérience demande à être expliquée:

I.–Le seuil de la testostérone (défini comme la plus petite quantité de cette hormone qui supprime l'excrétion de la créatine) a été trouvé de 250 $\gamma$ pour 100 g chez le cobaye thymiprive castré. Ce seuil est donc grandement influencé par la thyroïde[2].

II.–Chez le cobaye thymi-thyréoprive castré, des injections de thyroxine élèvent le seuil de la testostérone en fonction quadratique de la dose de thyroxine[1], 250 $\gamma$ de testostérone correspondraient à 13 $\gamma$ de thyroxine. Un cobaye thymi-thyréoprive castré ayant reçu cette dose de thyroxine pour 100 g de poids vif, réagit à la testostérone comme un castrat thymiprive (qui par ailleurs, excrète une quantité accrue de facteur thyréotrope).

III.–L'effet de 13 $\gamma$ de thyroxine sur la créatinurie a été trouvé annulé par définition par 13 unités-cobaye d'extrait de thymus[2].

Ces données ont pu servir à établir l'ordre de grandeur des doses des trois préparations injectées. Il s'agissait en somme:

1° de mettre le castrat thymi-thyréoprive dans un déséquilibre hormonal semblable à celui du castrat thymiprive (injection de thyroxine) du castrat thyréoprive (injection d'extrait de thymus) ou du sujet thymiprive (testostérone + thyroxine), ou bien:

2° de rétablir chez le même animal un équilibre semblable à celui du castrat (thyroxine + thymus) ou du cobaye normal (les trois préparations). Le résultat de ces confrontations est résumé dans le tableau II.

J. Comsa

Clinique infantile, hôpital civil de Strasbourg, le 5 décembre 1951.

*Summary*

(1) It had been stated previously that in guinea-pigs the rupture of the thymus-thyroid-gonad balance resulted in an increased thyrotropic activity of the anterior pituitary.

(2) An attempt is made to verify this assertion. It was to be expected that in thymi-thyreoprive castrated guinea-pigs (which do not secrete any thyrotropic factor) injections of one or several hormones of the thymus-thyroid-gonad group in an unbalanced relation might determine an increased thyrotropic activity of the urine.

(3) Experimental results have confirmed this supposition.

[1] K. Junkmann et W. Schoeller, Klin. Wschr. *11*, 1176 (1932). Elle a été résumée dans [4].

[2] J. Comsa, C. r. Soc. Biol. *141*, 917 (1947).

[1] J. Comsa, Physiol. comp. et O.E.C.O. (1951), sous presse.

[2] J. Comsa, R. Canad. biol. *7*, 615 (1948) (bibliographie); C. r. Acad. Sci. *228*, 2065 (1949); Bull. soc. chim. biol. *31*, 1035 (1949); Amer. J. physiol. *166*, 550 (1951).

## Toxizitätsmessung mittels Kleinlebewesen und elektrische Motilitätsbeobachtung

Kürzlich veröffentlichten Bosselaar und Spronk[1] die Beschreibung einer Apparatur zur optisch-elektri-

[1] C. A. Bosselaar und N. Spronk, Nature *169*, 18 (1952).

schen Motilitätsmessung von Spermien. In vollkommener Unabhängigkeit hievon haben wir für einen andern Zweck eine prinzipiell ähnliche Apparatur gebaut, die seit Februar 1951 in Gebrauch ist.

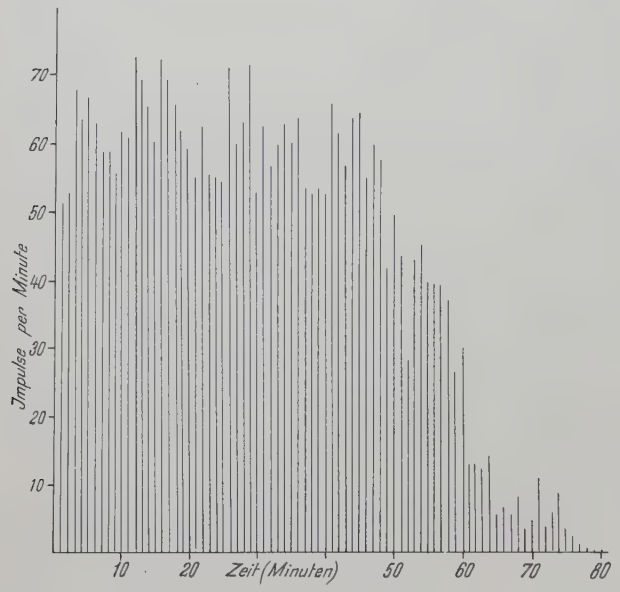



Abb. 1.

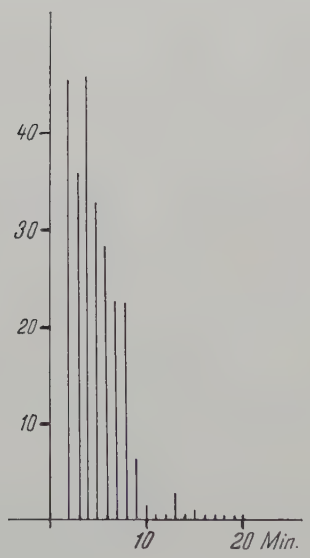



Abb. 2.

Abbildung 1 stellt die Abnahme der Durchschnittsmotilität einer Schar von etwa 20 Paramäzien unter Einfluss von 0,5% Mezcalinhydrochlorid dar; Abbildung 2 zeigt den Einfluss von $0{,}03‰$ $CuSO_4$. In entsprechenden Leerkontrollen mit nicht vergifteten Tieren würde sich das Bild der Motilitätsdarstellung, wie es sich in den ersten 40 min der Abbildung zeigt, fast unverändert über mehr als 10 h erhalten.

Bei der Suche nach toxischen Substanzen in Körperflüssigkeiten stellte sich die Aufgabe, allerkleinste Fraktionsmengen vergleichend auf ihre Toxizität gegenüber tierischen Organismen zu prüfen. *Paramaecium caudatum* erwies sich als hiezu geeignet, da in kleinen Glasküvetten schon die Einwirkung 50 µl betragender Flüssigkeitsmengen beobachtet werden kann. Um sich von der subjektiven Beurteilung der Motilitätsabnahme unabhängig zu machen, erfolgte die Beobachtung photoelektrisch.

Eine Küvette mit den Innenmassen $0{,}8 \cdot 7 \cdot 10$ mm, die die zu beobachtende Suspension der Paramäzien enthält, wird von einer Lichtquelle konstanter Intensität (Automobilscheinwerfer mit Batterie) schräg beleuchtet. Die Mittelebene der Flüssigkeitsschicht wird in etwa 10facher Vergrösserung auf eine Glasplatte projiziert, auf welche ein schachbrettartiges Raster aus Tuschequadraten von je 2 mm Seitenlänge aufgemalt ist. Die hellen Projektionsbilder der sich bewegenden Paramäzien gelangen also auf ihrer Bahn abwechselnd auf helle und dunkle Rasterfelder. Das durch die Linse auf die Photozelle gesammelte Licht wird bei jedem Eintritt eines Tierchenbildes von einem undurchsichtigen in ein durchsichtiges Rasterfeld eine Zunahme und bei jedem Austritt eine Abnahme an Intensität erfahren. Das den Lichtschwankungen entsprechende Wechselstromsignal der Photozelle wird verstärkt und gleich wie in der Anordnung von Bosselaar und Spronk durch eine Schmittsche Schaltung in Rechteckimpulse verwandelt. Letztere betätigen über eine Leistungsstufe einen Telephongesprächszähler.

Der Unterschied unserer Anordnung gegenüber der eingangs zitierten besteht, abgesehen von verstärkertechnischen Einzelheiten, darin, dass wir an Stelle der einfachen Lochblende zur Aufteilung der langsamen Bildbahnen der Paramäzien in Lichtimpulse ein Raster benötigen.

Die Anzahl der in der Zeiteinheit zu erwartenden Impulse stellt eine Funktion aus der Zahl und der mittleren Geschwindigkeit der Tiere dar. Angesichts der Möglichkeit von Koinzidenzen je zweier Bildbahnen mit zufälliger gegenseitiger Aufhebung der Lichtschwankungen sowie von optisch unwirksamen Bahnen hat die Messung statistischen Charakter. Mit unserer Vorrichtung zeigt der Zähler, wenn die Küvette mit etwa 10–20 frischen Tieren beschickt ist, grössenordnungsmässig etwa 50 Impulse je Minute an.

Über die Reproduzierbarkeit von Toxizitätsmessungen in Abhängigkeit von der Aufzucht der Versuchstiere sowie über Resultate an Fraktionen pathologischer Körperflüssigkeiten soll später berichtet werden.

R. Weber und W. Hügin

Wissenschaftliches Laboratorium der psychiatrischen Universitätsklinik «Friedmatt», Basel, den 28. Januar 1952.

*Summary*

Toxicity of solutions is estimated by observing the decrease in motility of *Paramaecium caudatum*. The motility is measured by means of an electro-optical device as follows: the paramaecia are dark-field illuminated and projected on a glass disk painted with a chess-board-like "Raster" pattern. The variations of light intensity induced thereby are counted by a photocell and a suitable amplifier-discriminator circuit.

## DISPUTANDA

### On the Binding of Dyes by Monomolecular Protein Layers

An article by Ch. Wunderly: *Über die Farbstoffbindung durch monomolekulare Proteinschichten*, Exper. 7, 296 (1951), claims to show in the words of the author "dass nicht so sehr die chemische Struktur des Farbstoffes für die Affinität verantwortlich ist als die Disper-

sion des Farbstoffsoles". As evidence for this, the author gives the results of measurements of the binding capacity of albumin and fibrinogen for five dyes. However, a close critical examination of the method followed and of the results fails to substantiate the claim made by the author. In the first place, it is difficult to see how some of the dye in the Gibbs' adsorption layer could be prevented from adhering to the protein when the latter is transferred to the glass slide. The removal of the adhering solution by means of filter paper does not diminish the uncertainty introduced by the method of removing the protein film. On the contrary it introduces a further complication since the equilibrium between solution and protein may be disturbed by the presence of the cellulose of the paper. But even if we neglect these shortcomings in the method, the results themselves are inconclusive. The author seems to base his claim merely on the fact that Congo Red, known to be associated in solution, shows the highest binding power of the dyes tested when expressed as molecules of dye bound per molecule of protein whereas the highly dispersed Naphthol Yellow shows so little affinity that it was not measurable.

Since the structure of Naphthol Yellow is very different from that of Congo Red, the claim that the association of the molecules of Congo Red rather than its structure is responsible for its higher affinity is certainly not justifiable. As to the other dyes tested, the author fails to quote any data on their degree of dispersion and his argument is therefore not very forceful. Moreover he is not on very safe ground when he bases his conclusions on the number of molecules of dye bound by one molecule of protein. The binding of the dyes tested takes place in all probability through the sulphonic groups; that is the dyes are bound to the protein in the form of anions. Therefore the number of equivalents rather than the number of molecules of the dye bound by a given weight of the protein should be the criterion used in comparing affinities. If the data in the article under discussion is recalculated on that basis one obtains the following:

| | Milliequivalents of dye bound by 1 g of protein | |
|---|---|---|
| | Albumin | Fibrinogen |
| Evans Blue . . . . . | 0·068 | 0·110 |
| Trypan Red . . . . . | 0·173 | 0·255 |
| Trypan Blue. . . . . | 0·228 | 0·298 |
| Congo Red . . . . . | 0·130 | 0·191 |

When expressed in this way, Congo Red does not give the highest result but it is second in order of increasing affinity. Of the dyes mentioned in the article, two have been studied by Rawson[1] and it may be noted that she obtained results at variance with those of Wunderly. By other methods, Rawson found that the affinity of Evans Blue for plasma albumin was appreciably higher than that of Trypan Blue. Wunderly also remarks that as the acidity of the solution is increased, the binding capacity of the protein for the dye increases. He advances this as another indication that the affinity is determined mainly by the degree of dispersion of the dye. However, it is well known that increasing the acidity of solutions containing anions capable of being bound by the protein will increase the amount of anions so bound. It is not surprising, therefore, that Wunderly noted an increased affinity as the pH of the solution was lowered.

P. Larose

Division of Chemistry, National Research Council, Ottawa, Canada, October 18, 1951.

[1] Ruth A. Rawson, Amer. J. Physiol. *138*, 708 (1943).

## Über die Farbstoffbindung durch monomolekulare Proteinschichten[1]

*Erwiderung auf die vorstehenden Bemerkungen*

Von P. Larose

Wir bedauern, wenn unsere Mitteilung den Eindruck erweckte, wir wollten mit den paar Messungen die komplexe Frage nach der Eiweiss-Farbstoffbindung abschliessend behandeln. Unsere Absicht war, einen Weg zu zeigen, wie man die Farbstoffbindung an gespreizte Proteinfilme messen kann. Vier der verwendeten sauren Azofarbstoffe gehen als Kolloidelektrolyte in Lösung und zeigen in derselben eine zunehmende Dispersion in der Reihenfolge Kongorot < Trypanblau < Trypanrot < Evans-Blue, wobei beträchtliche Teile der beiden zuletzt genannten Farbstoffe molekulardispers in Lösung gehen (vgl. Wunderly[2]); der Nitrofarbstoff Naphtholgelb geht molekulardispers in Lösung (vgl. Bennhold[3]). Unsere Versuche ergeben eine Abnahme der Bindung an das gespreizte Protein in der Reihenfolge Kongorot > Trypanblau > Trypanrot > Evans-Blue > Naphtholgelb, wobei die Bindung von Trypanblau zu Trypanrot besonders stark abnimmt (40 %) und Naphtholgelb nicht messbar gebunden wird. Stellen wir dieser kolloidchemischen Betrachtung die strukturchemische gegenüber, so ergeben die von P. Larose auf Grund der Sulfogruppen errechneten Milliäquivalente, in der Reihenfolge abnehmender Bindung, das Folgende: Trypanblau (4 Sulfogruppen) > Trypanrot (5) > Kongorot (2) > Evans-Blue (4, isomer mit Trypanblau). Da diese Reihenfolge offensichtlich stark abweicht von der experimentell gefundenen (siehe oben), müssen wir daran festhalten, dass unsere Resultate durch kolloidchemische Überlegungen besser erklärt werden als durch strukturchemische. Unser ursprünglicher Text zeigte, dass wir keinesfalls die Wichtigkeit der Farbstoffstruktur verkennen, nur ist diese mit unseren Ergebnissen nicht in einen kausalen Zusammenhang zu bringen.

Ch. Wunderly

Medizinische Universitätsklinik, Kantonsspital Zürich, den 8. Dezember 1951.

[1] Ch. Wunderly, Exper. *7*, 296 (1951).
[2] Ch. Wunderly, Z. ges. Exp. Med. *110*, 274 (1942).
[3] H. Bennhold, E. Kylin und St. Rusnyak, *Die Eiweisskörper des Blutplasmas* (Th. Steinkopff, Dresden 1938), S. 233.

## Model Experiments for the Production of Gastric Hydrochloric Acid

Under this title Szabó, Orsós, and Csányi[1] have recently put forward a hypothesis for the production of gastric hydrochloric acid from a weak acid[1]. This depends on the properties shown by ion-exchange resins. The views that the double decomposition of sodium

[1] Z. G. Szabó, S. Orsós, and L. Csányi, Exper. *7*, 297 (1951).

chloride and a weak acid, or the splitting of a protein hydrochloride by carbonic acid, could lead to the formation of the acid in gastric juice have been put forward on many occasions in the last 100 years (see review by Davies[1]) and can be ruled out as impossible. Primary oxyntic cell secretion can be produced continuously, contains about 0·16 *M*-hydrochloric acid and is isotonic with blood. To form the acid at this strength from carbonic acid directly in oxyntic cells would require the impossibly high concentration of 17 *M* (Davenport[2]). Now, although the ion-exchange system of Szabó *et al.*[3] apparently by-passes the difficulty of this high concentration, the laws of thermodynamics require that the same energy as would be needed to produce such a concentration must be supplied at some stage in any alternative route from the carbonic acid of the cells to the acid of the gastric juice. This difficulty is veiled in the model presented by Szabó *et al.*[3], but it is here that the weakness of their case lies. Not less than about 10,000 cal. are required per gram molecular weight of gastric hydrochloric acid as secreted (for discussion see Davies and Ogston[4]). The process must therefore be coupled with energy-giving reactions in the cell and cannot occur spontaneously.

Since the pH of 0·1 *n*-succinic acid is only 2·7, it is of interest that Szabó *et al.*[3] (Table III) obtained a solution of pH 1·23 (0·06 *M*-$H^+$) from 0·1 *n*-succinic acid, 2% sodium chloride and Amberlite IR-105. This was possible because the resin had been turned from the sodium to the hydrogen form by the successive application of 0·1 *n*-succinic acid. The hydrogen ions were then liberated at a higher concentration from the resin by applying a stronger solution of sodium chloride (2%, 0·34 *M*). Still higher acidities could be obtained by the use of even more concentrated sodium chloride solutions. It is important to realize that the energy needed to make this higher concentration of hydrogen ions came from that originally required to make the 2% sodium chloride used in the experiments of Szabó *et al.*[3].

For such a process to be operative continuously in the stomach the oxyntic cells would therefore have to be able to do secretory work on sodium chloride to make the very strong and very weak ("distilled water") solutions required. Whilst the stomach can certainly secrete hydrogen ions and must therefore contain a structure capable of liberating these ions into solution, this liberation is much more likely to follow from oxidation-reduction changes (Davies[5]) than from, for example, the alternating association of hydrogen and sodium ions with some hypothetical insoluble acid radicles. A coherent theory has been based on the first possibility but the second requires a mechanism for concentrating sodium ions, which presents at least as difficult a problem as the concentration of the hydrogen ions themselves (Davies and Ogston[6]).

Thus whilst it is conceivable that ion exchange may play a part in gastric acid secretion, it is impossible for processes of the type described by Szabó *et al.*[3] to occur in the stomach without a continuous energy supply. Since these workers do not specify or consider such an energy supply their experiments are not acceptable models for the production of gastric hydrochloric acid.

R. E. Davies and P. A. H. Wyatt

Medical Research Council Unit for Research in Cell Metabolism, Department of Biochemistry, and Department of Physical Chemistry, University of Sheffield, England, October 5, 1951.

[1] R. E. Davies, Biol. Rev. *26*, 87 (1951).
[2] H. W. Davenport, J. Physiol. *97*, 32 (1939).
[3] Z. G. Szabó, S. Orsós, and L. Csányi, Exper. *7*, 297 (1951).
[4] R. E. Davies and A. G. Ogston, Biochem. J. *46*, 324 (1950).
[5] R. E. Davies, Biol. Rev. *26*, 87 (1951).
[6] R. E. Davies and A. G. Ogston, Biochem. J. *46*, 324 (1950).

## Ion Exchange and Permeability

*Reply to the preceding remarks of*

R. E. Davies and P. A. H. Wyatt

In a short communication[1] we have reported on double decompositions carried out upon ion-exchange resins which can be considered as a model of the gastric hydrochloric acid formation in relation to the separation of ions from reaction mixture.

In our considerations we have omitted the energetics, being only interested in the kinetics, the mechanism of the process. Davies estimated the energy needed for this endothermic reaction to be about 10,000 cal. This work could be supplied in the case of our model by the activation energy which proved to be just as great in other experiments[2]. In the organism the cell metabolism can furnish this energy simultaneously.

In the exchange reactions—in our model experiments—the concentration ratios differ appreciably from those in the oxyntic cells. However, the remark of Davies referring to the data of Davenport is not valid concerning the formation of 0·16 *M* hydrochloric acid requiring a carbonic acid concentration of 17 *M* in the oxyntic cells, because there is no equilibrium in the stomach but only a stationary state. In this case, however, the ion-exchange substances are especially appropriate systems for the development of concentrations differing from the equilibrium values.

In ion-exchange processes the quantity of the ion exchanged pro unit of time is a function of the capacity, whilst the maximal concentration developed depends on the exchange potential.

The ion-exchange substances may play their part concerning the separation of the ions governed by the exchange potential on the basis of their operation being. Without assuming this valve-like function the permeability processes of the organism can hardly be interpreted, and—in our opinion—this is true also in the case of the oxydation-reduction changes of Davies. Ion exchange processes in the substances of the organism are possible, as the recently published experiments of Hudson and Schmeichler[2] suggest.

Z. G. Szabó and L. Csányi

Department of Chemistry, University of Szeged, Hungary, November 23, 1951.

[1] Z. G. Szabó, S. Orsós, and L. Csányi, Exper. *7*, 297 (1951).
[2] R. F. Hudson and G. A. Schmeichler, J. Phys. Coll. Chem. *55*, 1120 (1951).

# Nouveaux livres - Buchbesprechungen - Recensioni - Reviews

## Taschenbuch für Chemiker und Physiker

Von Jean D'Ans und Ellen Lax
1896 Seiten
(Springer-Verlag, Berlin 1949)

Dem «Taschenbuch», das seinem Umfange nach besser als Tabellenbuch bezeichnet würde, hat seine Exaktheit in Fachkreisen den Namen «kleiner Landolt-Börnstein» eingetragen. Die vorliegende 2. Auflage weist gegenüber der früheren keine wesentlichen Änderungen, aber eine bedeutende Verminderung der Druckfehler auf. Der Referent möchte die Herausgeber dazu anregen, die tabellarisch zusammenfassbaren Ergebnisse der biologischen und der Naturstoff-Chemie, ihrer derzeitigen Bedeutung gemäss, zu berücksichtigen. Dazu sollte man aus dem Abschnitt «Physiologische Chemie» ein Kapitel «Biochemie» (physikalische Chemie der Zellen und Gewebe) machen. Insbesondere wären begrüssenswert: Angaben über die Redoxpotentiale biologisch wichtiger Substanzen, physikalische Daten von Proteinen und anderen hochmolekularen Naturstoffen, Permeabilitätskonstanten, Membranpotentiale, Aktivierungsenergien von Enzymenreaktionen, Absorptionsspektren von Naturstoffen, Schemata über intermediäre Stoffwechselvorgänge, etwas über Kolorimetrie und ähnliches. Die Übersichtstabellen organischer Verbindungen und die angegebenen analytischen Methoden würden unter kritischer Sichtung auf Entbehrliches auch für den Naturstoffchemiker nützlicher gestaltet werden können. Schliesslich wäre es zu begrüssen, wenn das Register, dem Handbuchcharakter entsprechend, einen grösseren Umfang bekäme, was die Benutzung des sonst ausgezeichneten Werkes sehr erleichterte. H. J. Bielig

## Ecological Animal Geography

*Based on "Tiergeographie auf ökologischer Grundlage"*

By the late Richard Hesse
2nd ed. by W. C. Allee and K. P. Schmidt
715 pages with 142 Figures
(John Wiley & Sons, New York, 1951) ($9.50)

Das Standardwerk Hesses, 1924 herausgekommen, wurde 1937 von W. C. Allee (Professor für Biologie an der Universität Florida) und K. P. Schmidt (Vorstand der Zoologischen Abteilung des Naturhistorischen Museums, Chicago) in englischer Übersetzung herausgegeben. Im grossen und ganzen konnten die amerikanischen Autoren Hesses Werk unverändert lassen.

Seit 1937 hat sich nun eine grosse Fülle neuer Tatsachen angesammelt, und neue Anschauungen über tiergeographische Probleme sind entwickelt worden. Deshalb erwies sich eine gründliche Überarbeitung der ersten englischen Auflage als unerlässlich. Die soeben erschienene 2. Auflage bringt in vielen Kapiteln wertvolle Ergänzungen. Ausserdem erwies es sich als notwendig, die Terminologie zu revidieren und zu vereinfachen. Endlich ist die Bibliographie der einzelnen Kapitel übersichtlicher dargestellt und auf den neuen Stand ergänzt.

Man wird den amerikanischen Autoren für all diese Änderungen Dank schuldig sein, wenn man auch nicht mit ihrer Auffassung einig gehen kann, dass durch sie «ein im wesentlichen neues Werk» entstanden sei, denn die Gesamtanlage und die Stoffdisposition ist (erfreulicherweise) diejenige geblieben, die wir Hesse verdanken. J. Seiler

# Informations - Informationen - Informazioni - Notes

STUDIORUM PROGRESSUS

## Zur Analyse von Kerngrössenfrequenzkurven

*Zugleich ein Beitrag zur Frage der Polyploidieerzeugung in Gewebekulturen*

Von Otto Bucher[1]

In einigen früheren Arbeiten[2] haben wir dargestellt, in welcher Weise sich *Kerngrössenmessungen* auch an *Bindegewebekulturen* (Deckglaskulturen) *in vitro* durchführen lassen. Das *Prinzip* ist folgendes: Wir zeichnen die fixierten und mit Eisenhämatoxylinlack gefärbten Kulturen mit Hilfe eines Projektionszeichenapparates bei 1500facher linearer Vergrösserung und planimetrieren dann die so erhaltenen Projektionsflächen. Wenn 2 Kernvolumina im Verhältnis 1:2 stehen, so verhalten sich, wie wir abgeleitet haben (Bucher und Horisberger, loc. cit.), die von uns ermittelten zugehörigen Projektionsflächen wie 1:1,5875. Diesen Faktor brauchen wir zur Berechnung der Klassen, in welche wir das durch Messen erhaltene Zahlenmaterial zur variationsstatistischen Verarbeitung einteilen, wobei wir für die Kerngrösse natürlich das logarithmische Einteilungsprinzip benutzen[1].

Ist die Verteilung eines bestimmten Zahlenmaterials symmetrisch, dann kann die Mitte der Hauptklasse (das heisst der Regelklasse, die das Frequenzmaximum enthalten wird) als geometrisches Mittel bestimmt werden. Davon ausgehend lassen sich dann sämtliche Klassengrenzen mit Hilfe unseres oben angegebenen Faktors er-

[1] Histologisch-embryologisches Institut der Universität Lausanne.
[2] O. Bucher, Mikroskopie *5*, 124 (1950). – O. Bucher und R. Gattiker (II. Mitteilung), Acta anat. *10*, 430 (1950). – O. Bucher und B. Horisberger (I. Mitteilung), Acta anat. *9*, 258 (1950).

[1] Dazu auch O. Bucher und R. Gattiker (V. Mitteilung), Z. Zellforsch. *37*, 56 (1952). – E. Hintzsche, Exper. *1*, 103 (1945); Schweiz. Z. Volkswirtsch. Statist. *82*, 433 (1946).

mitteln, wobei wir zwischen je zwei aufeinanderfolgende Regelklassen, deren mittlere Volumina sich wie 1:2 verhalten, immer noch drei Zwischenklassen einschieben.

Wenn die einem bestimmten Kernmaterial entsprechende Grössenvariationskurve indessen nicht symmetrisch ist, wie das für das vorliegende Untersuchungsgut der Fall ist, dann ist die «richtige» Klasseneinteilung viel schwieriger. Wir behelfen uns vorläufig so, dass wir dann das Material in unsere 6 gegeneinander fortlaufend etwas verschobenen «Standardklassentypen» (Bucher, loc. cit., Tabelle I) einteilen, die erhaltenen Frequenzkurven im allgemeinen so aufeinanderlegen, dass die Scheitelordinaten zusammenfallen, und für jede Grössenklasse die zugehörige Frequenz (Ordinate) als arithmetisches Mittel aus den entsprechenden Ordinaten der 6 «Standardkurven» berechnen. Die daraus resultierende Kurve nennen wir Mittelwertskurve. In unserer V. Mitteilung[1] über «Karyometrische Untersuchungen an Gewebekulturen» haben wir – ausgehend von mathematisch definierten Verteilungen – gezeigt, dass die sogenannte Mittelwertskurve von der Ausgangskurve nicht mehr gesichert abweicht.

Die in Abbildung 1 *a* dargestellten Frequenzkurven sind solche sogenannten Mittelwertskurven. Die ausgezogene Kurve gibt die Kerngrössenverhältnisse in der Aussenzone der experimentell beeinflussten Kaninchen-Bindegewebekulturen wieder und basiert auf der Messung von 1650 Kernen; die unterbrochen gezeichnete Kurve wurde aus den Messungsresultaten von 600 Kernen in parallel geführten Kontrollkulturen ermittelt. Wir konnten hier mit einer relativ geringen Zahl von Messungen auskommen, da wir in nicht parallel jenen Versuchen gezüchteten unbeeinflussten Kaninchen-Bindegewebekulturen schon etwa 15000 Kerne ausgewertet haben und uns das Material deshalb sehr gut bekannt ist.

Die Versuchskulturen sind während eines Tages oder einer Nacht *mit Colchicinlösungen* von 1:10 Millionen oder 1:20 Millionen *vorbehandelt* worden (was grundsätzlich zum gleichen Resultat führte); die Fixierung erfolgte frühestens 24 Stunden nach dem Auswaschen des Giftes. Den Kontrollkulturen ist an Stelle der Giftlösung reine Tyrodelösung zugesetzt worden. Die aus den Colchicinversuchen gewonnene Kerngrössenvariationskurve ist asymmetrisch und besitzt eine auffallend breite Basis (grössere Variationsbreite). In einer früheren Arbeit habe ich schon darauf hingewiesen, dass in den mit Colchicin vorbehandelten Kulturen, verglichen mit unbeeinflussten Kulturen, viel weniger Kerne der Grössenklasse $K_2$ vorkommen, während in die Regelklasse $K_4$ noch $80^0/_{00}$ der Kerne fallen (verglichen mit $27^0/_{00}$ in den Kontrollen). Im einzelnen ist der Kurvenverlauf kaum zu deuten. Indessen verstärkte sich mit zunehmender Erfahrung auf dem Gebiete der Karyometrie an Gewebekulturen der Eindruck, dass es sich um eine Kurve handeln muss, die durch die Superposition zweier eingipfliger Kurven (im Idealfalle mit Maxima auf den Regelklassen $K_2$ und $K_4$) zustande gekommen ist. Damit stellte sich das *Problem, wie eine solche Summenkurve in ihre beiden Teilkurven zerlegt werden kann.*

Wie wir dabei vorgegangen sind, soll im folgenden Schritt um Schritt beschrieben werden (vgl. auch Abb. 1 *a–d* und Tabelle I). Um uns besser verständigen zu können, haben wir die aufgetragenen Abszissenpunkte (Kerngrössenklassen) in Abbildung 1a noch fortlaufend numeriert.

[1] O. Bucher und R. Gattiker, Z. Zellforsch. *37*, 56 (1952).

Nehmen wir einmal als Arbeitshypothese an, die eine, mehr oder weniger symmetrische Kurve hätte, wie die Kontrollkurve, ihr Frequenzmaximum in der Regelklasse $K_2$ (oder zumindest in unmittelbarer Nachbarschaft von $K_2$); nennen wir sie deshalb kurz «$K_2$-Kurve». Zu ihrem aufsteigenden Schenkel gehören die Abszissenpunkte 1 bis 8; zu ihrem absteigenden Schenkel würden dann die Punkte 8–15 oder allerhöchstens bis 16 gehören, wobei die Ordinate zum Abszissenpunkt 16 indessen so gering wäre, dass sie nicht weiter ins Gewicht fällt. Unter dieser Voraussetzung gehört die Strecke 16–22 zur zweiten Teilkurve, von der wir einmal annehmen, ihr Maximum falle in die Regelklasse $K_4$ – wir nennen sie deshalb «$K_4$-Kurve» – und sie sei ebenfalls symmetrisch: Dann entspricht dem Endabschnitt 16–22 des absteigenden Schenkels der Anfangsteil 2–8 des aufsteigenden Schenkels (vgl. Kolonne IV in der Tabelle). Die Ordinaten 1–8 des aufsteigenden Schenkels der «$K_2$-Kurve» lassen sich nun berechnen als Differenz der Ordinaten der Summenkurve und der der «$K_4$-Kurve» (Kolonne V, Abb. 1 *b*). Die zum Abszissenpunkt 9 gehörenden approximativen Frequenzen haben wir in der Zeichnung nur noch orientierungshalber angegeben.

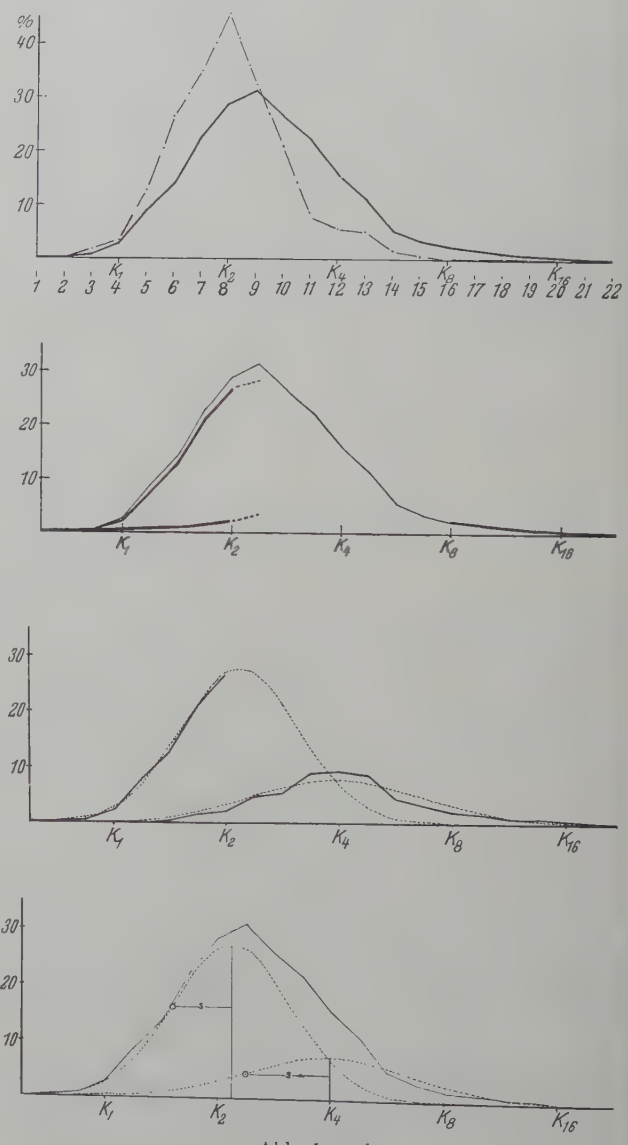



Abb. 1 *a–d.*

| I | II Klassen-bezeichnung | III Frequenzen der Summenkurve | IV provisorische «$K_4$-Kurve» (Grenz-bereich) | V provisorische «$K_2$-Kurve» (aufsteigender Schenkel) | VI «$K_2$-Kurve» als Normal-verteilung berechnet | VII «$K_4$-Kurve» als Differenz III–VI | VIII «$K_4$-Kurve» als Normal-verteilung berechnet | IX Summe der beiden Normal-verteilungen VI + VIII | X $\frac{d^2}{e}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | *a* | 0,6 | | 0,6 | 0,2 | (0,4) | | 0,2 | |
| 2 | *b* | 2,3 | 0,0 | 2,3 | 1,2 | (1,1) | | 1,2 | 0,14 |
| 3 | *c* | 4,4 | 1,1 | 3,3 | 4,5 | (–0,1) | 0,4 | 4,9 | |
| 4 | $K_1$ | 13,1 | 2,2 | 10,9 | 13,8 | (–0,7) | 1,0 | 14,8 | 0,22 |
| 5 | *a* | 42,9 | 4,7 | 38,2 | 34,3 | (8,7) | 2,4 | 36,7 | 0,90 |
| 6 | *b* | 68,9 | 5,0 | 63,9 | 66,9 | 2,0 | 4,9 | 71,8 | 0,12 |
| 7 | *c* | 113,1 | 7,9 | 105,2 | 105,6 | 7,5 | 9,2 | 114,8 | 0,03 |
| 8 | $K_2$ | 143,8 | 10,4 | 133,4 | 133,4 | 10,4 | 15,3 | 148,7 | 0,17 |
| 9 | *a* | 156,3 | | | 133,4 | 22,9 | 22,6 | 156,0 | 0,00 |
| 10 | *b* | 132,2 | | | 105,6 | 26,6 | 30,0 | 135,6 | 0,09 |
| 11 | *c* | 110,7 | | | 66,9 | 43,8 | 35,5 | 102,4 | 0,62 |
| 12 | $K_4$ | 80,0 | | | 34,3 | 45,8 | 37,6 | 71,9 | 0,82 |
| 13 | *a* | 57,1 | | | 13,8 | 43,3 | 35,5 | 49,3 | 1,06 |
| 14 | *b* | 26,8 | | | 4,5 | 22,3 | 30,0 | 34,5 | 2,21 |
| 15 | *c* | 16,5 | | | 1,2 | 15,3 | 22,6 | 23,8 | 3,23 |
| 16 | $K_8$ | 10,4 | 10,4 | | 0,2 | 10,2 | 15,3 | 15,5 | 2,50 |
| 17 | *a* | 7,9 | 7,9 | | | 7,9 | 9,2 | 9,2 | 0,21 |
| 18 | *b* | 5,0 | 5,0 | | | 5,0 | 4,9 | 4,9 | |
| 19 | *c* | 4,7 | 4,7 | | | (4,7) | 2,4 | 2,4 | 1,42 |
| 20 | $K_{16}$ | 2,2 | 2,2 | | | (2,2) | 1,0 | 1,0 | |
| 21 | *a* | 1,1 | 1,1 | | | (1,1) | 0,4 | 0,4 | |
| | | 1000,0 | | | 719,8 | | 280,2 | 1000,0 | 13,74 |

Nach unseren vorausgehenden Untersuchungen (vgl. besonders BUCHER und GATTIKER, V. Mitt.) haben wir Grund zu der Annahme, dass die gesuchten Variationskurven mehr oder weniger normalen Verteilungen entsprechen oder ihnen zumindest recht nahe kommen. Aus dem aufsteigenden Schenkel 1–8 der «$K_2$-Kurve» können wir nun ohne weiteres die diesem empirischen Kernmaterial entsprechende Gauss-Laplacesche Normalverteilung berechnen nach der Formel:

$$y = \frac{1}{\sqrt{2\,\pi}} \cdot e^{-x^2/2} = 0{,}3989 \cdot e^{-x^2/2},$$

wobei $x$ Abszissenpunkt (= Kerngrösse),
$y$ zugehörige Ordinate (= Frequenz),
$\pi$ 3,14159,
$e$ 2,71828 (Basis der natürlichen Logarithmen).

Die zu einer ganzen Anzahl von $x$-Punkten gehörenden Ordinaten (in $^0/_{00}$ des Frequenzmaximums) haben wir in unserer eben zitierten Arbeit tabellarisch zusammengestellt, wobei wir einfachheitshalber nicht mit den reellen $x$-Werten, sondern mit Stufen arbeiten. Für unsere «$K_2$-Kurve» haben wir den Stufennullpunkt bei 8,5 angenommen. Ausserdem müssen wir zur Charakterisierung der Kurve noch die mittlere quadratische Abweichung $s^2$ berechnen, da die $x$-Stufen in $s$-Einheiten sind, also zum Aufzeichnen noch mit $s$ multipliziert werden müssen.

$$s^2 = \frac{\Sigma\, x^2 \cdot f - \bar{x} \cdot \Sigma x \cdot f}{N-1}$$

wobei $N$ die Gesamtfrequenz, $f$ die einer bestimmten Kerngrösse zugeordnete Einzelfrequenz ist. Auch zur Berechnung des Frequenzmaximums benötigen wir den Kennwert $s$:

$$\max = \frac{0{,}4 \cdot N}{s}$$

(Einzelheiten können zum Beispiel bei GEBELEIN und HEITE[1] nachgelesen werden).

[1] H. GEBELEIN und H. J. HEITE, *Statistische Urteilsbildung* (Springer-Verlag, 1951).

Die so errechnete Normalverteilung der «$K_2$-Kurve» ist in Kolonne VI unserer Tabelle angegeben und in Abbildung 1 *c* eingezeichnet. Man erkennt, dass die Schenkel 1–8 der empirischen und der berechneten Kurve sehr gut miteinander übereinstimmen; statistisch besteht kein gesicherter Unterschied zwischen beiden, wie zum Beispiel die Anwendung der $\chi^2$-Methode zeigt.

Nun bilden wir die Differenz zwischen den Ordinaten der Ausgangssummenkurve und den entsprechenden Ordinaten der als Normalverteilung berechneten «$K_2$-Kurve»; diese Differenzen (Kolonne VII) sind die Ordinaten der «$K_4$-Kurve». Aus diesen Werten können wir wiederum die zugehörige Normalverteilung berechnen (Kolonne VIII). Für diese Berechnung haben wir die eingeklammerten Frequenzen der Kolonne VII weggelassen, da sie – im Wahrscheinlichkeitsgrenzbereich der Kurve gelegen – ohnehin nicht mehr zuverlässig sind, denn es liegt ihnen eine allzu geringe Zahl von Kernen zugrunde. Die Scheitelordinate der Normalverteilung fällt praktisch auf die Mitte von $K_4$. Die mittlere Abweichung $s$ (= Abstand der Wendepunkte der Kurve, in denen die Kurvenschenkel vom konvexen in den konkaven Verlauf übergehen, von der Symmetrieachse) ist bei der «$K_4$-Kurve» wesentlich grösser ($s$ = 2,98) als bei der «$K_2$-Kurve» ($s$ = 2,11), das Frequenzmaximum entsprechend kleiner ($37{,}6\,^0/_{00}$ gegen $135{,}8\,^0/_{00}$). Auch die als Normalverteilung berechnete «$K_4$-Kurve» stimmt mit der in Abbildung 1 *c* dick eingezeichneten Ausgangskurve überraschend gut überein.

Im ganzen fallen von den $1000\,^0/_{00}$ Kerngrössenfrequenzen der empirischen Summenkurve, von der wir ausgegangen sind, $719{,}8\,^0/_{00}$ auf die «$K_2$-Kurve» und $280{,}2\,^0/_{00}$ auf die «$K_4$-Kurve». In Kolonne IX der Tabelle haben wir noch für jeden Abszissenpunkt die Ordinaten der beiden berechneten Normalverteilungen addiert und damit die Werte einer neuen, durch Berechnung ermittelten Summenkurve erhalten (vgl. auch Abb. 2, gestrichelte Kurve), von der wir uns fragen müssen, ob sie von der Ausgangskurve (dünn ausgezogen) statistisch abweicht oder nicht. Wir haben deshalb zwischen entsprechenden Frequenzen die Differenz $d$ gebildet, diese ins Quadrat

erhoben, durch den entsprechenden Frequenzwert $e$ der Ausgangskurve dividiert und in Kolonne X der Tabelle eingetragen. Die Summe dieser Kolonne, das heisst die Summe der Quotienten $d^2$ über $e$, ist das $\chi^2$. Es beträgt in unserem Fall nur 13,74, während es, um einen statistisch auch nur schwach gesicherten Unterschied zu beweisen (für $P = 0{,}05$), bei 15 Freiheitsgraden mindestens 24,996 betragen müsste, wie aus den entsprechenden Tabellen der Statistikbücher zu entnehmen ist. Die Ausgangssummenkurve und die Summenkurve, die – gewissermassen als Probe – durch Addition der beiden errechneten Normalverteilungen erhalten wurden, stimmen deshalb praktisch überein. Auch das spricht – neben den biologischen Überlegungen – dafür, dass die als Arbeitshypothese angenommenen Voraussetzungen richtig waren.

Das Prinzip unseres Vorgehens bei der Kurvenzerlegung ist, aus Kurventeilen, die als unvermischt (also einer Teilkurve allein zugehörend) gelten können, die ganzen Kurven als Normalverteilung zu berechnen.

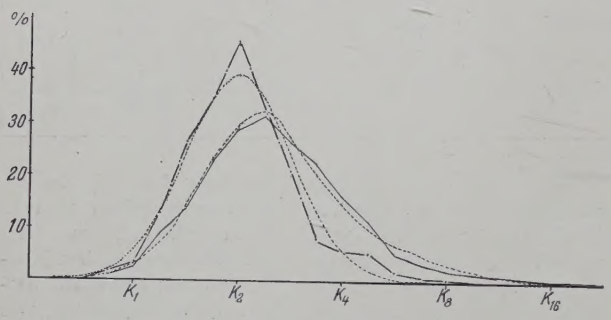



Abb. 2.

In Abbildung 2 ist noch die aus den Kontrollkulturen ermittelte Kerngrössenfrequenzkurve, deren Maximum auf $K_2$ fällt, mitsamt der dem empirischen Kernmaterial entsprechenden berechneten Normalverteilung dargestellt. Verglichen mit der «Erfahrungskurve» (auf der Basis von 3000 Messungen) ist sie auffällig schmal und hoch.

Nach diesen statistisch-mathematischen Ausführungen mögen noch einige Worte der *biologischen Seite des Problems* gewidmet sein. Wir haben nun als Resultat der Zerlegung einer schwer deutbaren «Summenkurve» *zwei* eingipflige Kurven, deren Frequenzmaximum (annähernd) auf $K_2$ und auf $K_4$ fallen, also auf Regelklassen, deren mittlere Volumina sich wie 1:2 verhalten. Dieser Befund ist ausserordentlich interessant, haben wir doch bei vielen Tausenden von Kerngrössenbestimmungen in Bindegewebekulturen des Menschen und verschiedener Tiere[1] immer nur *eine* eingipflige Variationskurve ermittelt, deren Maximum für die Aussenzone der Kultur auf $K_2$ (für die Innenzone auf $K_1$) fällt. Durch die Colchicinvorbehandlung wird ein weiteres, wenn auch bei unserer Versuchsanordnung weniger hohes Frequenzmaximum bei $K_4$ gebildet; anders ausgedrückt heisst das, dass in der Kultur eine weitere Kernkategorie mit verdoppelten Volumen in Erscheinung getreten ist. Es liegt auf der Hand, diese Befunde im Sinne einer *Polyploidisierung* zu deuten, wie ich an anderer Stelle weiter ausgeführt habe[1], und es ist meines Wissens das erstemal, dass an tierischen Gewebekulturen *in vitro* experimentell Polyploidie erzeugt und durch Karyometrie nachgewiesen wurde.

[1] O. Bucher und R. Gattiker (II. Mitteilung), Acta anat. *10*, 430 (1950); Rev. Suisse Zool. *57*, 769 (1950). – O. Bucher, Verh. Anat. Ges., 49. Vers. (1951).

*Résumé*

Après un court exposé de la méthode adéquate qui permet de mesurer des noyaux dans des cultures de tissus *in vitro*, et du procédé de l'évaluation statistique, on analyse une courbe de fréquence des volumes nucléaires, établie à partir de cultures qui ont été influencées par la colchicine. Cette courbe asymétrique, à base large, est considérée comme étant le résultat d'une superposition de 2 courbes dont les sommets correspondent très porbablement aux classes nucléaires $K_2$ et $K_4$, tandis que la courbe des variations, obtenue sur les cultures témoins, est très élancée et présente un seul maximum de fréquence en $K_2$. Il est démontré comment on peut procéder à la décomposition de la courbe composée, à la condition que les courbes constituantes ressemblent à celle d'une distribution normale. De l'analyse résultent deux courbes de fréquence dont les volumes nucléaires moyens sont dans le rapport de 1 à 2. Tandis que dans les cultures non traitées – dans la zone marginale dont nous parlons uniquement – il n'y a qu'un type de cellules dont les volumes nucléaires se répartissent autour de $K_2$, dans les cultures exposées à l'influence de la colchicine on décèle un deuxième type cellulaire dont les volumes nucléaires varient autour de $K_4$, ce qui veut dire que, en principe, ses noyaux sont devenus deux fois plus grands. On interprète ce fait comme étant dû à la polyploïdie des cellules qui est elle-même une conséquence de l'action temporaire de la colchicine. La méthode caryométrique nous permet de distinguer les cellules polyploïdes des cellules diploïdes.

[1] O. Bucher, Julius-Klaus-Archiv Vererbungsforsch. *26*, 177 (1951).

## Corrigendum

H. Granados: *The Occurrence of an Abnormal Black Pigment in the Incisors of Albino Rats Reared on certain Purified Diets*, Exper. *8*, 154 (1952).

P. 155, left column, line 14 from the top, should read "1·9 $cm^3$" instead of 1·9 cm.

Pharmazeutische
Spezialpräparate
unter der Marke

CILAG

geniessen Weltruf

CILAG AKTIENGESELLSCHAFT
SCHAFFHAUSEN

# ARCHIV DER MATHEMATIK

ARCHIVES OF MATHEMATICS ARCHIVES DE MATHÉMATIQUES

Herausgegeben in Verbindung
mit dem Mathematischen Forschungsinstitut in Oberwolfach
von H. KNESER und W. SÜSS

Beirat: G. BOL, E. BOMPIANI, P. TEN BRUGGENCATE, J. DIEUDONNÉ, CH. EHRESMANN, H. GÖRTLER, H. HADWIGER, H. HOPF, W. MAGNUS, T. NA-GELL, CHR. PAUC, J. RADON, K. REIDEMEISTER, J. A. SCHOUTEN, H. SEIFERT, E. SPERNER, E. STIEFEL

Redaktion: H. BILHARZ, Universität Freiburg i. Br.

Erscheint seit 1948; jetzt ab Band 3 (1952) regelmässig in 6 Heften von je ca. 80 Seiten Umfang. Format 17 × 24 cm. Abonnementspreis pro Band sFr. 60.– (DM 60.–), Einzelheft sFr. 12.– (DM 12.–)

Das ARCHIV DER MATHEMATIK veröffentlicht in erster Linie *Originalarbeiten* aus dem Gesamtgebiet der Mathematik und ihrer unmittelbaren Anwendungen (bis zu 10 Druckseiten Umfang) in deutscher, englischer, französischer oder italienischer Sprache. Daneben können in beschränktem Masse *Selbstreferate* über bislang unveröffentlichte grössere Arbeiten, deren wissenschaftliche Bedeutung dies gerechtfertigt erscheinen lässt, Aufnahme finden. In diesen Selbstreferaten werden ausser den Resultaten die wesentlichen Schritte der Beweisführung mitgeteilt. Schliesslich gelangen in zwangloser Folge *zusammenfassende Berichte* über die Fortschritte einzelner Sondergebiete, die in rascher Entwicklung begriffen sind, mit ausführlichen Literaturangaben zum Abdruck.

Erscheint ab Jahrgang III (1952) im

VERLAG BIRKHÄUSER BASEL

*Zu beziehen durch jede Buchhandlung*